

IN VIVO UND IN VITRO UNTERSUCHUNGEN
AN DEN BAKTERIOCHLOROPHYLL
B HALTIGEN ORGANISMEN
ECTOTHIORHODOSPIRA HALOCHLORIS,
ECTOTHIORHODOSPIRA ABDELMALEKII
UND RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

Robert Steiner

*Das
München
1984*

IN VIVO UND IN VITRO UNTERSUCHUNGEN
AN DEN
BAKTERIOCHLOROPHYLL B HALTIGEN ORGANISMEN
ECTOTHIORHODOSPIRA HALOCHLORIS,
ECTOTHIORHODOSPIRA ABDELMALEKII UND
RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

vorgelegt
von
Robert Steiner
aus
München

Oktober 1984

1. Berichterstatter: Prof. H. Scheer

2. Berichterstatter: Prof. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Danksagungen:

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scheer, Botanisches Institut der Universität München angefertigt. Herrn Prof. Scheer gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung der Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. R. Cogdell, Glasgow und Herrn Dr. R. Feick für ihre wertvollen Diskussionsbeiträge zu großem Dank verpflichtet.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. J. Imhoff, Bonn für die Bereitstellung sämtlicher Bakterienkulturen sowie für die Einführung in die mikrobiologischen Zuchtmethoden. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. E. Cmiel, Garching sowie mit Herrn Dr. W. Schäfer, Martinsried und Herrn Dipl. Chemiker A. Schnatterer, München konnten die Oxidationsprodukte von Bchl b identifiziert und ein Reaktionsmechanismus aufgestellt werden.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. G. Wanner für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, und Herrn Dipl. Physiker A. Angerhofer, Stuttgart für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Dr. R. Brunisholz, Zürich für die Aminosäuresequenzdaten.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgesellschaft (SFB 143) unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	
1. Photosynthetische Bakterien	1
2. Pigmente der photosynthetischen Bakterien	1
3. Die photosynthetische Einheit	3
3.1. Das Reaktionszentrum	3
3.2. Die Lichtsammel Komplexe	4
4. Das Special Pair	6
5. Aufgabenstellung	7
<u>Experimenteller Teil</u>	
1. Allgemeine Bedingungen	9
2. Anzucht der Bakterien	9
2.1. Medienzubereitung	9
2.2. Ernte der Bakterien	9
3. Pigmentisolierung und Reinigung	9
3.1. Chromatographie auf DEAE Zellulose	10
3.2. Chromatographie auf Sepharose	10
4. Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	11
5. Dünnschichtchromatographie (DC)	12
5.1. DC auf selbstgestrichenen Platten	12
5.2. DC auf HPTLC - Fertigplatten	12
6. Phäophytinisierung der Bakteriochlorophylle	13
7. Umesterung der Bakteriochlorophylle	13
8. Verseifen von Chlorophyllen	13
9. Darstellung von Referenzverbindungen	13
9.1. 3-Acetyl-3-devinylchlorophyll a	13
9.2. Protoporphyrin-IX-dimethylester	14
10. Gaschromatographie	14
11. Massenspektroskopie	15

	Seite
12. Kernresonanzspektroskopie	15
13. Fluoreszenzspektroskopie	15
14. Absorptionsspektroskopie	15
15. Circulardichroismus	16
16. Darstellung von Membranpartikeln	16
16.1. Chromatophore (inside-out Partikel)	16
16.2. Spheroplasten (rightside-out Partikel)	17
17. Dissoziation der Chromatophore	17
18. Kontrollierte Proteolyse von Membranpartikeln	17
19. SDS - Gelelektrophorese von Membranproteinen	18
20. Photochemie von Bakteriochlorophyll b	19
21. Anaerobe Photoreaktion	19
22. Oxidation von Limonen	20
23. Elektronenmikroskopie	20

Ergebnisse

<u>Isolierung der Tetrapyrrolpigmente Bchl b haltiger Organismen</u>	21
--	----

PROTOPORPHYRIN-IX EIN AUSSCHIEDUNGSPRODUKT DES BCHL B HALTIGEN BAKTERIUMS E. HALOCHLORIS

1. Problemstellung und Einführung	23
2. Isolierung und Reinigung	23
3. Charakterisierung und Identifizierung	24
3.1. Spektroskopischer Vergleich	25
3.1.1. Absorptionsspektroskopie	25
3.1.2. Derivativspektroskopie	25
3.2. Chromatographischer Vergleich	28
3.2.1. Dünnschichtchromatographie	28
3.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	28
4. Zusammenfassung und Diskussion	29

UNTERSUCHUNG DER PIGMENTE VERSCHIEDENER, ANDERER BAKTERIENSTÄMME

1.	Einführung und Theorie	30
2.	Absorptionsspektroskopie	30
3.	HPLC-Versuche an den extrahierten Pigmenten	33
4.	Untersuchung des Pigments von E. abdelmalekii	34
4.1.	Vergleich im HPLC	34
4.2.	Vergleich im GC	36
5.	Zusammenfassung und Diskussion	37

PHOTOOXIDATION VON BAKTERIOCHLOROPHYLL B

1.	Einführung	38
2.	Vergleich der Oxidation mit DDQ und der Oxidation durch Licht	39
2.1.	Dünnschichtchromatographischer Vergleich	39
2.2.	Vergleich im HPLC	40
3.	Lösungsmittelabhängigkeit der Photooxidation	41
3.1.	Dünnschichtchromatographie	41
3.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	41
4.	Kinetik der Photooxidation von Bchl b in Abhängigkeit vom Lösungsmittel	42
4.1.	Spektroskopische Verfolgung der Photo- oxidation	42
4.2.	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten	43
4.3.	Bestimmung der Halbwertszeiten	43
4.4.	Zusammenfassung	44
5.	Identifizierung der Photooxidationsprodukte	44
5.1.	Absorptionsspektroskopie	44
5.2.	Kernresonanzspektroskopie der Methylphäo- phorbide	46
5.2.1.	H-NMR der schnellsten Fraktion	46
5.2.2.	H-NMR der mittelschnellen Fraktion	48
5.3.	Massenspektroskopie	49
5.3.1.	MS der schnellsten Fraktion	49
5.3.2.	MS der mittelschnellen Fraktion	50

	Seite
5.4. Diskussion der Ergebnisse und Zuordnung der Strukturen	50
6. Mechanismus der Photooxidation	52
6.1. Anaerobe Photoreaktion	53
6.2. Zusammenfassung und Extinktionskoeffizienten von Bchl b	54
6.3. Quenchversuche	55
6.4. Theorie der Singulett-Sauerstoff Bildung	55
6.5. Nachweis durch Zusatz von Limonen	56
6.5.1. Gaschromatographie der entstandenen Alkohole	56
6.5.2. Vergleich mit Literaturdaten	57
6.6. Theorie der ene-reaction	58
6.7. Möglicher Angriff von $^1\text{O}_2$ auf Bchl b	58
6.8. Zusammenfassung	60
Überleitung	61

BCHL B - PROTEINE AUS E. HALOCHLORIS

CHARAKTERISIERUNG DES REAKTIONSZENTRUMS VON E. HALOCHLORIS

1. Hell-Dunkel-Differenzspektren an Chromatopho- ren von E. halochloris	63
2. Ausbleichmessungen bei verschiedenen Detergenskonzentrationen	64
2.1. Versuche mit LDAO	64
2.2. Versuche mit Triton X-100	65
3. Hell-Dunkel-Differenzspektren	66
4. Der Proteinanteil des Reaktionszentrums	66

ISOLIERUNGSVERSUCHE DER REAKTIONSZENTREN VON E.HALOCHLORIS

1.	Chromatographie	69
1.1.	Ausschluß (=Gel) Chromatographie	69
1.2.	Cytochrom c Affinitätschromatographie	70
1.3.	Ionenaustauschchromatographie auf DEAE Zellulose	71
1.3.1.	Variation der Pucheu - Methode	71
1.3.2.	Stabilisierung durch pH-Änderung	71
1.3.3.	Stabilisierung durch Zugabe von Natrium- ascorbat	72
1.3.4.	Variation des zur Dissoziation eingesetzten Tensids	72
1.3.5.	Zusammenfassung der Chromatographie Versuche	74
2.	Ultrazentrifugation im Dichtegradienten	74
2.1.	Variation des zur Dissoziation eingesetzten Tensids	75
2.2.	Variation der Tensidkonzentration	75
2.3.	Stabilisierung durch NaCl	75
2.4.	Stabilisierung durch Zusatz von Deriphat	76
2.5.	Steigerung der Tensidkonzentration	76
2.6.	Zusammenfassung der Zentrifugationsversuche	77
3.	Sonstige Methoden	77
4.	Zusammenfassung	78

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LICHTSAMMLER-CHLOROPHYLL-PROTEINE VON E. HALOCHLORIS

1.	Präparation	79
2.	Absorptionsspektrum der Antennenfraktion	79
3.	SDS-Gelelektrophorese	80
4.	Aminosäuresequenz des kleinsten Antennen- peptids	84
5.	Verfolgung im Elektronenmikroskop	86

	Seite
5.1. Untersuchung von Membranfraktionen	86
5.2. Elektronenmikroskopische Verfolgung der Dissoziation der Chromatophore	88
6. Der Helixgehalt der <i>E. halochloris</i> Antenne	89
6.1. Theorie	89
6.2. Anwendung auf die <i>E. halochloris</i> Antenne	91
7. Absorptionsänderungen	93
7.1. Absorptionsänderungen durch Säure	93
7.1.1. Reversibilität	94
7.1.2. Vergleich mit anderen Präparationen photo- synthetischer Bakterien	95
7.2. Versuche zur Proteinmodifizierung	96
7.3. Absorptionsänderungen durch Zugabe von Harnstoff	97
7.3.1. Abhängigkeit der Harnstofftitration vom pH-Wert	98
7.3.2. Problem der Reversibilität	101
8. Absorptionsänderungen durch Zusatz von Protease	101
8.1. Theoretische Grundlagen	101
8.2. Absorptionsspektroskopie	101
9. Weitere Charakterisierung der 1020 und 960nm Form	102
9.1. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	103
9.2. Circular dichroismus	104
9.3. Zentrifugation im Dichtegradienten	107
10. Zusammenfassung	107

TOPOLOGIE DER *E. HALOCHLORIS* MEMBRAN

1. Darstellung der ganzen Membran von <i>E.</i> <i>halochloris</i>	108
2. Proteolytischer Abbau	109
3. Zuordnung Gel - Absorption	112
4. Proteolyse an Spheroplasten	112

	Seite
5. Verfolgung des proteolytischen Abbaus im Elektronenmikroskop	113
6. Aufstellen eines Membranmodells	117
6.1. Modell des Lichtsammler Komplexes	117
6.2. Modell der gesamten Photosynthesemembran	121
6.3. Vergleich mit anderen Modellen	123
Zusammenfassung	126
Übersicht über die verwendeten Tenside	129
Literaturverzeichnis	134

Abkürzungen

Bchl	Bakteriochlorophyll
Bchl _a _p	Bakteriochlorophyll a, mit Phytol verestert
Bphe	Bakteriophäophytin
Chl	Chlorophyll
CD	Circulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DDQ	Dichlorodicyanobenzochinon
DHGG	Dihydrogeranylgeraniol
E	Ectothiorhodospira
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENDOR	Elektronenkerndoppelresonanz
ESR	Elektronenspinresonanz
GC	Gaschromatographie
GG	Geranylgeraniol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
H-NMR	Kernresonanzspektroskopie
kDa	Kilodalton
LH	Lichtsammler
LHCP	Lichtsammler Chlorophyll Protein
MWG	Molekulargewicht
MS	Massenspektroskopie
NIR	nahes Infrarot
ODMR	Optisch detektierte, magnetische Resonanz
P	Phytol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PE	Petrolether
Q	Chinon
Rp	Rhodopseudomonas
Rsp	Rhodospirillum
RC	Reaktionszentrum
RT	Raumtemperatur

RP	reversed phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
THGG	Tetrahydrogeranylgeraniol
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett

Diacetylchl a: 3,8-Diacetyl-3-devinyl-8-deethylchlorophyll a

Hydroxiethylchl a: 3-Acetyl-3-devinyl-8-hydroxiethyl-8-deethyl-
chlorophyll a

Acetylchl a: 3-Acetyl-3-devinylchlorophyll a

1. Photosynthetische Bakterien

Unter Photosynthese versteht man die biologische Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie. Dieser grundlegende Prozeß der Energiegewinnung ist auf vielfältige Art bei den unterschiedlichsten Lebewesen realisiert. So sind es nicht nur höhere Pflanzen und Algen, sondern auch Cyanophyceen, photosynthetische Bakterien und Halobakterien, die auf dieser Grundlage gedeihen. Mit Ausnahme der letzteren benutzen alle Chlorophylle. Stellt man einmal "normale" Pflanzen und die photosynthetisch aktiven Bakterien einander gegenüber, dann gibt es vor allem drei Unterschiede:

1. Photosynthetische Bakterien besitzen "nur" ein Photosystem, sind in dieser Hinsicht also einfacher aufgebaut und damit überschaubarer in den Primärprozessen der Photosynthese.
 2. Sie können, im Gegensatz zu Pflanzen, die nur Wasser als Elektronendonator verwenden, auch andere mit geringerem Redoxpotential benutzen, etwa H_2S oder organische Verbindungen.
 3. Sie sind nicht zuletzt relativ leicht zu handhaben.
- Dies führt dazu, daß heute viele Erkenntnisse, die die Biochemie der photosynthetischen Primärprozesse betreffen, an photosynthetischen Bakterien gewonnen werden.

2. Pigmente der photosynthetischen Bakterien

All diesen Organismen gemeinsam ist ein mehr oder weniger reichhaltiges Inventar an Pigmenten, und auch in dieser Hinsicht haben es die Bakterien zu einer nahezu unüberschaubaren Vielzahl gebracht.

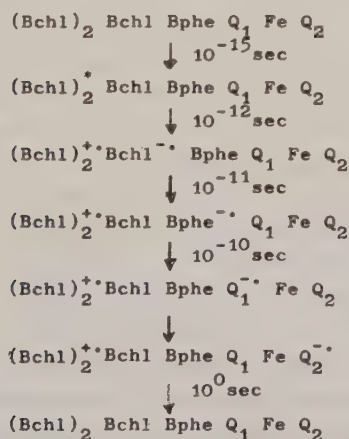
Während bei höheren Pflanzen Chl a und Chl b vorherrscht, sind es bei Bakterien v.a. Bchl a und Bchl b. Diese unterscheiden sich durch zwei Besonderheiten von "normalen" Chlorophyllen: Zum einen sind sie an Ring B zwischen C_7 und C_8 hydriert, besitzen also zwei hydrierte Ringe im Makrozyklus, sodaß man im Absorptionsspektrum isolierter Bakteriochlorophylle neben der langwelligen Q_y -Bande auch eine deutlich ausgeprägte Q_x -Bande findet. Zum anderen sind alle Bakteriochlorophylle an C_{31} oxidiert.

3. Die photosynthetische Einheit

Von allen photosynthetischen Organismen sind es wohl die Bakterien, denen es gelungen ist, auch noch sehr energiearmes Licht für ihre Zwecke auszunützen. So findet man etwa bei Bchl b-haltigen Organismen eine in vivo Absorption bei 1020 nm, also im nahen IR. Um diese langwellige Absorption erklären zu können ist es nötig, sich auch mit den Proteinen der photosynthetischen Membran zu beschäftigen.

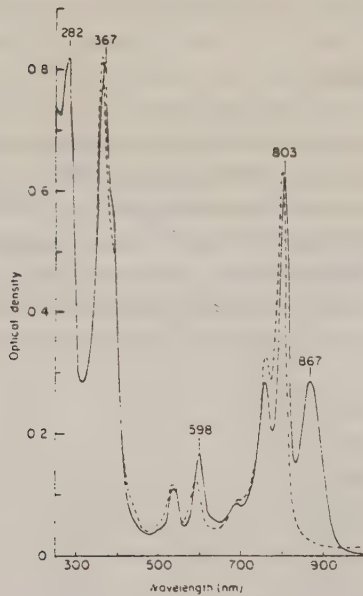
3.1. Das Reaktionszentrum

Von vielen photosynthetischen Bakterien gelingt es, intakte RCs zu isolieren (Dutton et al, 1978; Cogdell, 1983), die einen Teil der Elektronentransportkette beinhalten und im Millisekundenbereich zur Ladungstrennung fähig sind. Das folgende Bild zeigt einen schematischen Elektronenfluß, wie man ihn sich für das RC von Rp. sphäroides vorstellt, dem biophysikalisch am besten charakterisierten RC (Feher und Okamura, 1978; Clayton, 1980):



Die schnellste Reaktion ist dabei die Anregung des Bchl-Dimers in etwa 10^{-15} sec. Auf die primäre Ladungstrennung (etwa nach 10^{-12} sec) folgen eine Reihe von Elektronenübertragungen, bis schließlich der Ausgangszustand wieder erreicht ist.

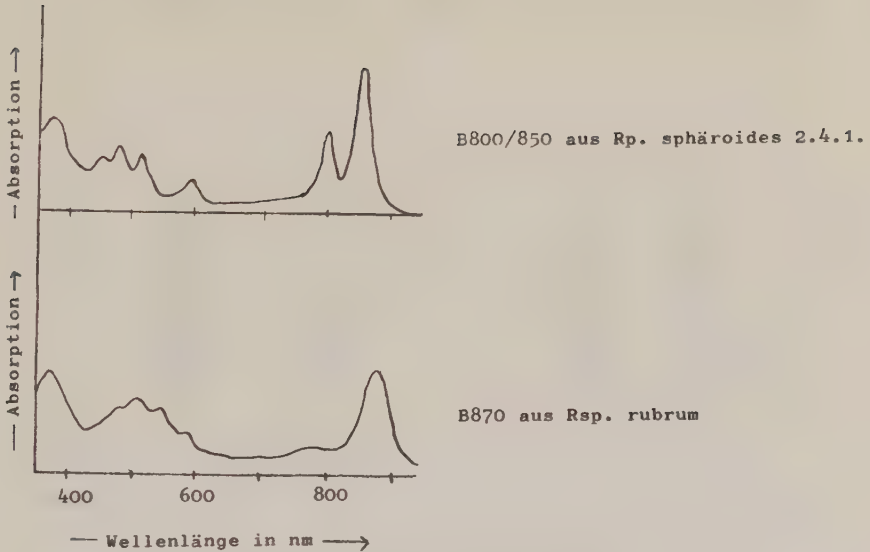
Im folgenden ist das Absorptionsspektrum eines RCs von Rp. sphäroides dargestellt. Die gestrichelte Kurve gibt das Starklichtspektrum an, das nach dem oben gesagten dem Zustand $(\text{Bchl})_2^{+*} \text{Bchl Bphe } Q_1 \text{ Fe } Q_2^{-*}$ entspricht:



(aus: Clayton, 1980)

3.2. Die Lichtsammler Komplexe

Neben solchen photosynthetisch aktiven Einheiten (Cogdell et al, 1982) gibt es eine zweite große Klasse von Proteinkomplexen, die für photosynthetischen Energiegewinn von Bedeutung sind: die Lichtsammler Komplexe. Im Folgenden ist das Absorptionsspektrum der beiden Antennenkomplexe B800/850 und B870 von Rp. sphäroides 2.4.1. bzw. von Rsp. rubrum dargestellt:

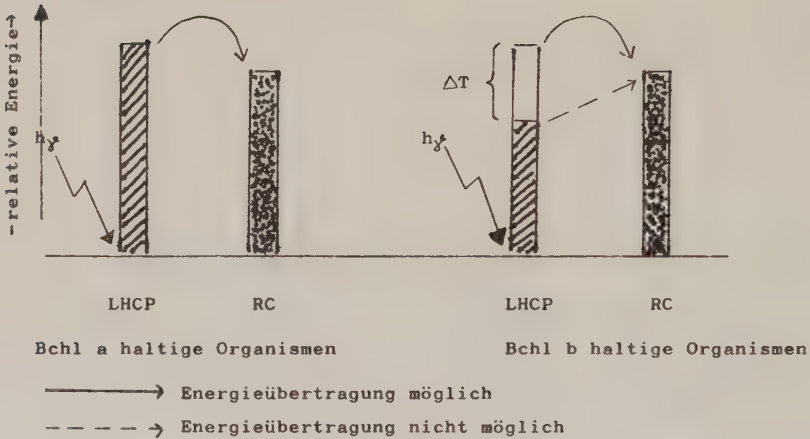


(aus Cogdell und Thornber, 1980)

Generell sind in der Natur drei unterschiedliche Antennentypen (Pearlstein, 1982) - bezogen auf die Thermodynamik der Energieübertragung auf das RC - verwirklicht:

1. Die Antenne absorbiert kurzwelliger als das RC (z.B. Phyco-bilisomen).
2. Antennenmoleküle und RC absorbieren etwa bei der gleichen Wellenlänge (bei grünen Pflanzen); eine Energieübertragung ist thermodynamisch noch erklärbar.
3. Die Antenne absorbiert langwelliger als das RC. Dies findet man in allen Bchl b haltigen Organismen und gelegentlich auch in Algen. Eine Energieübertragung ist nur erklärbar, wenn man a. für die fehlende Energiedifferenz etwa thermische Energie berücksichtigt und b. das System als kinetische Falle wirkt, d.h. der Energiequant muß innerhalb seiner Lebenszeit das RC erreichen und dort "sofort" gefangen werden.

Schematisch sind die Verhältnisse in der folgenden Abb. zusammengefaßt:



4. Das Special Pair

Viel Arbeit ist in den letzten Jahren daraufhin verwendet worden, wie das langwellige Absorptionsmaximum der Bchle im RC zustande kommt. Unter anderem aus ESR-Daten ist bekannt (Corrker, 1976; Lendzian, 1982), daß durch einen Lichtquant ein Bchl-Dimer angeregt wird (Feher et al, 1975). Das gebildete $(Bchl)_2^+$ kann durch seine ungewöhnliche ESR Bandbreite als Dimer nachgewiesen werden. Verschiedene Modelle zeigen, daß sich, wenn man zwei Bchle in geeigneter Geometrie (Anregungsdipole parallel) genügend nahe bringt, das Absorptionsspektrum ins IR verschiebt (Fong, 1975; Fong und Koester, 1975; Fong et al, 1976; Hoff, 1984). Erst durch ENDOR Daten läßt sich dann aber die nähere Geometrie dieser beiden Chle beschreiben (Norris et al, 1974; 1975; Scheer et al, 1977; Hoff und Mö-

buis, 1978; Lendzian, 1982; Kurreck et al, 1984). Daß aber auch ganz andere Verhältnisse vorliegen können, zeigen Untersuchungen an den RCs höherer Pflanzen (Scheer et al, 1984).

5. Aufgabenstellung

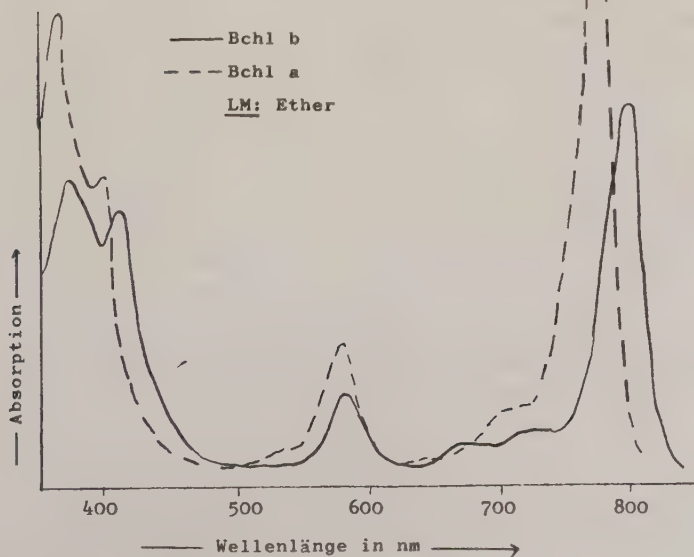
Oben wurde bereits auf den chemischen Unterschied verschiedener Bchl hingewiesen und, wie bereits gesehen, sind viele Untersuchungen an dem Bchl a haltigen Organismus *Rp. sphäroides* durchgeführt worden. Im Vergleich zu Bchl a ist Bchl b wegen seiner exocyclischen Doppelbindung (Baumgarten, 1970; Scheer et al, 1974) eine sehr instabile Substanz, und viele Autoren weisen auf unbekannte Chlorine hin, die bei der Aufarbeitung entstehen (Davis et al, 1979). Im folgenden sind die Absorptionsspektren von Bchl a und b in Ether angegeben. Absorptionsmaxima treten dabei bei folgenden Wellenlängen auf:

Bchl b:

794	676	578	408	368	Wellenlänge in nm
1,0	0,13	0,25	0,73	0,81	A_{λ}/A_{794}

Bchl a:

770	572	392	356	Wellenlänge in nm
1,0	0,24	0,54	0,85	A_{λ}/A_{770}



Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Bchl b haltigen Organismen *Rp. viridis* (Drews und Giesbrecht, 1966), *E. halochloris* (Imhoff und Trüper, 1977) und *E. abdelmalekii* (Imhoff und Trüper, 1981). Dies sind neben *Thiocapsa pfennigii* (Seftor und Thornber, 1984) und *Rp. sulfoviridis* (Eimhjellen et al, 1967) die einzigen Bakterien, die dieses Pigment enthalten.

Zu Beginn dieser Arbeit war, mit Ausnahme des RC von *Rp. viridis* (Michel, 1982) kaum etwas über die Proteinkomplexe Bchl b haltiger Organismen und praktisch nichts über die der beiden *Ectothiorhodospira* Spezies bekannt. Dies lag zum Großteil wohl daran, daß das Pigment sehr labil ist und seine Chemie noch weitgehend unbekannt war.

Es sollte zunächst versucht werden, die Chemie des Bchl b näher zu charakterisieren und dabei insbesondere die oft auftretenden Oxidationsprodukte zu identifizieren. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Pigment-Protein Komplexen, also mit RC und LHCP. Dabei sollte, da das RC von *Rp. viridis* nun kristallisiert werden konnte (Michel, 1982), ein topologisches Modell der *E. halochloris* Membran entworfen werden.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Bedingungen

Falls nicht anders angegeben, wurde immer bidest. Wasser verwendet; die Chemikalien waren analysenrein und die Lösungsmittel vorher durch Destillation gereinigt. Die Versuche mit isoliertem Bchl b wurden in grünem Sicherheitslicht durchgeführt oder es wurde soweit als möglich im Dunkeln gearbeitet. Versuche mit Proteinen wurden, wenn nicht extra auf anderes hingewiesen wird, bei Raumtemperatur durchgeführt; auch dabei wurde der Einfluß von Störlicht wenn möglich durch Abdunkeln ausgeschlossen.

2. Anzucht der Bakterien

2.1. Medienzubereitung

E. halochloris und *E. abdelmalekii* wurden in den bereits beschriebenen Medien gezogen (Imhoff und Trüper, 1977; Imhoff und Trüper, 1981; Steiner, 1980). Es wurden jedoch folgende Veränderungen durchgeführt (Imhoff, pers. Mitt.):

- Auf die Zugabe von Na_2SO_4 und Vitaminlösung wird verzichtet
- Die Anzucht wurde in 18l Behältern durchgeführt.

Rp. viridis wurde im gleichen Maßstab, wie bereits beschrieben angezogen (Gloe, 1977; Hajek, 1981).

2.2. Ernte der Bakterien

Dabei wurde genauso verfahren wie bereits angegeben (Steiner, 1980).

3. Pigmentisolierung und Reinigung

Auch diese beiden Arbeitsschritte wurden bereits w.o. beschrieben. Zusätzlich zur Zuckersäulenchromatographie (Steiner, 1980)

wurden jedoch noch zwei weitere Chromatographie Verfahren angewandt, um Bchl b rein zu erhalten.

3.1. Chromatographie auf DEAE Zellulose

DEAE Zellulose (DE 52, Whatman, Maidstone, England) wurde in Methanol suspendiert und in eine Säule gegeben ($\varnothing = 1\text{cm}$, $h = 10\text{cm}$). Anschließend wurde die Zellulose stufenweise, langsam in Chloroform überführt (modifiziert nach Sato und Murata, 1978; Gottstein, 1984). Dazu equilibriert man die Säule mit jeweils etwa dem doppelten Säulenvolumen der folgenden Lösungsmittelgemische:

1. MeOH
2. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/9$
3. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 3/7$
4. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/1$
5. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 4/3$
6. CHCl_3

Die Pigmente (Rohextrakt, isoliert nach Strain und Svec, 1966) wurden in CHCl_3 gelöst und aufgetragen. Als Fließmittel diente ebenfalls CHCl_3 .

3.2. Chromatographie auf Sepharose

(modifiziert nach Omata et al, 1983)

Eine wässrige Suspension von Sepharose CL 4B (15ml) wurde in einer Fritte mit folgenden Lösungsmitteln vorbehandelt:

1. Wasser
2. Aceton
3. Aceton/PE = 2/1
4. Aceton/PE = 1/2
5. PE/2-Propanol = 10/1
6. PE/2-Propanol = 20/1

Im letzten Lösungsmittelgemisch wurde anschließend eine Säule gefüllt (Abmessungen w.o.) und die Probe, in PE gelöst, auf-

getragen. Als Elutionsmittel diene ebenfalls PE, wobei zusätzlich der n-Propanol Anteil stufenweise erhöht wurde.

Nach der Trennung kann die Sepharose mit folgenden Lösungsmitteln wieder regeneriert werden:

1. MeOH
2. Aceton
3. Aceton/PE = 1/1
4. Aceton/PE = 1/9
5. PE
6. PE/2-Propanol = 10/1
7. PE/2-Propanol = 20/1

4. Analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Durch HPLC lassen sich sowohl Chlorophylle, als auch Phäophytine gut trennen und charakterisieren. Die Retentionszeit ist dabei für jede Substanz eine charakteristische Größe.

Geräte: HPLC Waters System

Model 6000 A (zwei Pumpen)

Model U 6 K (Injektor)

LDC Model 1202 (variabler Wellenlängen Doppelstrahl-Detektor)

Säulen: 1. Stahl, 250 x 5mm

gepackt mit LiChrosorb RP-8, 5 - 10µm; Fa. Knauer

2. Stahl, w.o.

gepackt mit LiChrosorb RP-18, 5 - 10µm; Fa. Waters

Fluß: 1.5 ml/min

Selektive Detektionswellenlängen:

580 nm (Absorptionsmaximum von Bchl b)

600 nm (Absorptionsmaximum von Bchl a)

675 nm (Absorptionsmaximum von Bchl b_{ox})

530 nm (Absorptionsmaximum von Bphe b)

520 nm (Absorptionsmaximum von Bphe a)

Laufmittelsysteme:

1. 95% MeOH, 5% Wasser (Schoch et al, 1978): geeignet für Bchl a
2. 89% MeOH, 11% einer wässrigen, 1%igen Natriumascorbatlösung

(Steiner et al, 1982): geeignet für Bchl b

3. 94% MeOH, 6% einer wässrigen, 1%igen Natriumascorbatlösung:
geeignet für Bchl b

4. 91% MeOH, 9% Wasser: geeignet für Bchl a

5. 80% MeOH, 20% Wasser: geeignet für Methylphäophorbide.

5. Dünnschichtchromatographie (DC)

5.1. DC auf selbstgestrichenen Platten

Verwendet wurde Kieselgel H, Typ 60 der Fa. Merck. Präparative Trennungen wurden mit einer Schichtdicke von 0.5mm ausgeführt. Die Platten (20x20cm) wurden vor Gebrauch 3h im Trockenschrank bei 140°C aktiviert. Als Laufmittel fanden folgende Lösungsmittelgemische Verwendung:

System 1: Anlaufmittel: Aceton/Tetra = 20/80

Laufmittel: Aceton/Tetra = 10/90

System 2: Anlaufmittel w.o.

Laufmittel: Aceton/Tetra = 3/97

System 3: Laufmittel: Aceton/Tetra = 20/80

System 7: Laufmittel: Aceton/Tetra = 40/60

5.2. DC auf HPTLC - Fertigplatten

Zur schnellen DC Bestimmung von Substanzen bieten sich HPTLC Fertigplatten der Fa. Merck an:

System 4: normal-phase HPTLC

Laufmittel: Aceton/Tetra = 20/80

System 5: normal-phase HPTLC

Laufmittel: Aceton/Tetra = 25/75

System 6: reversed-phase HPTLC

Laufmittel: MeOH

6. Phäophytinisierung der Bakteriochlorophylle

Von Bchl a läßt sich, wie bei den Chlorophyllen höherer Pflanzen, leicht Bphe a durch Zugabe von HCl darstellen, wobei man jedoch viel mehr Säure benötigt (mehr als 5% Endkonzentration). Für die Darstellung von Bphe b liefert nur die Entmetallierung mit 5%iger, methanolischer Schwefelsäure vertretbare Ergebnisse (mit ca. 80% Ausbeute) (Davis et al, 1979; Steiner, 1980).

7. Umesterung der Bakteriochlorophylle

Eine Darstellung von Methylphäophorbiden gelang durch 90 minütiges Rückflußkochen mit methanolischer Schwefelsäure (Steiner, 1980). Die Aufarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben (Steiner, 1980) durch Verteilen zwischen Ether und Wasser, wobei der Methylester in die organische Phase geht.

8. Verseifen von Chlorophyllen

Die Abspaltung des mit dem Propionsäurerest veresterten Alkohols gelang durch alkalische Esterhydrolyse (Benz, 1980; Steiner, 1980).

9. Darstellung von Referenzverbindungen

9.1. 3-Devinyl-3-acetylchlorophyll a

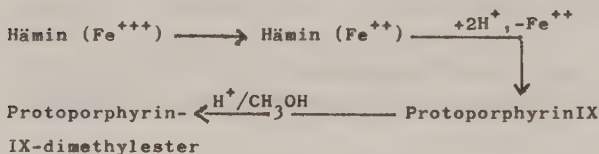
Aus Bchl a ließ sich durch Oxidation mit DDQ 3-Devinyl-3-acetylchlorophyll a herstellen (Smith und Calvin, 1966; Steiner, 1980). Die Umwandlung ließ sich dabei gut spektroskopisch verfolgen, da die langwellige Absorption des Bchl a bei 770nm verschwand und eine neue bei 678nm auftauchte (Lösungsmittel: Aceton).

9.2. Protoporphyrin-IX-dimethylester

Protoporphyrin-IX-dimethylester wurde aus Hämin dargestellt (verändert nach Smith, 1975; Whitlock Jr. et al, 1969):

- 0,1g Hämin in 7,5ml Ether lösen
- 50ml N_2 gesättigte Essigsäure zugeben; die Lösung wurde dabei mit N_2 gespült, um Oxidationen zu vermeiden (Cox und Whitten, 1982)
- langsam 5ml gesättigte $FeSO_4$ Lösung in $HCl_{konz.}$ zutropfen lassen und 2 min rühren
- in 30ml eiskalte, gesättigte Natriumacetat Lösung und 20ml Ether geben
- mit Ether ausschütteln, mit Wasser waschen, die Etherlösung mit NaCl trocknen und am Rotationsverdampfer einengen
- Umesterung wie unter Nr.7 (s.S. 13) beschrieben.

Schematisch läßt sich diese Reaktion folgendermaßen zusammenfassen:



10. Gaschromatographie

Freie und gereinigte Alkohole lassen sich gaschromatographisch untersuchen (Steiner, 1980; Steiner et al, 1981).

Gerät: Varian Aerograph Series 1800

Säule: OV 101 (25m) oder SP 1000 (20m)

Bedingungen: isotherm $130-176^\circ C$

O,9at; Carrier He

Injektortemp.: $225^\circ C$

splittlose Injektion: 60ml/h

Als Standarts Substanzen wurden verschiedene C_{20} -Alkohole aus Weizen verwendet: Phytol, 2,14-THGG, 2,10,14-DHGG und GG.

11. Massenspektroskopie

Massenspektren wurden von Herrn Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, an einem Massenspektrometer CH 7a/SS 100 (Varian MAT, Bremen) aufgenommen. Verwendet wurde Elektronenstoß-Ionisation bei 70eV (1mA).

12. Kernresonanzspektroskopie

H-NMR-Spektren wurden von Herrn Dr. E. Cmiel an einem Bruker WH 90 aufgenommen. Lösungsmittel war CDCl_3 mit TMS als internem Standart. Die Proben wurden dabei folgendermaßen vorbereitet:

- lösen in CH_2Cl_2
- auf einem Wasserbad PE langsam zutropfen lassen
- über Nacht bei RT ausfällen lassen
- abzentrifugieren und PE vorsichtig abdekantieren
- über Kieselgel im Hochvakuum trocknen.

13. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden von Herrn Dipl. Physiker A. Angerhofer in Stuttgart aufgenommen. Zur Verfügung stand ein selbstgebautes Fluorimeter mit einem Kryostat, der mit He_1 arbeitete.

14. Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren wurden entweder an einem DMR 22 (Zeiss, Oberkochen) oder an einem PE 320 (Perkin-Elmer, Überlingen) aufgenommen. Am ersten Gerät sind mittels einer selbstgebauten Beleuchtungseinrichtung auch Ausbleichmessungen möglich. Am zweiten Gerät konnten auch Derivativspektren aufgenommen werden.

15. Circular dichroismus

CD-Spektren wurden an einem Dichrograph V (ISA-Unterhaching) aufgenommen. Außerdem stand ein Datenverarbeitungssystem (Leonard, Lille) mit modifizierter Software zur Verfügung. Die Spektren im UV Bereich wurden in 1mm, die im sichtbaren und im IR in 10mm Quarzküvetten gemessen.

16. Darstellung von Membranpartikeln

Als Ausgangspunkt für die Isolierung von Membranproteinkomplexen dienten definierte Membranpartikel. Ganz allgemein ließen sich zwei verschiedene Typen darstellen, nämlich einmal Chromatophore, das sind Partikel deren cytoplasmatische Seite außen liegt, und Spheroplasten, also solche, die die periplasmatische Seite außen haben.

Chromatophore sind streng genommen nur geschlossene inside-out partikel. Der Begriff "Chromatophore" wurde hier allgemeiner gefaßt, unabhängig davon, ob sie tatsächlich geschlossen sind, was bei Bchl b haltigen Organismen allgemein nicht der Fall ist (Engelhardt, pers. Mitt.).

16.1. Chromatophore (=inside-out Partikel)

(modifiziert nach Feher und Okamura, 1978)

Geerntete und gewaschene Bakterien wurden in Tris Puffer (10mM pH=7.5) aufgenommen und im Potter sorgfältig homogenisiert; das Homogenat wurde anschließend 2-3 mal durch die French-Press gegeben (ca. 20000psi) und die Zellen so aufgebrochen. Daran schloß sich eine 30 minütige Zentrifugation bei 10.000g an, um größere Partikel abzutrennen. Daraufhin wurde DNase, CaCl_2 und MgCl_2 zugegeben und bei RT im Dunkeln 1h lang gerührt. Bei einer weiteren, 60 minütigen Ultrazentrifugation bei 200.000g sedimentieren die "Chromatophore". Eine Zentrifugation bei 100.000g lieferte jedoch auch schon ausreichende Er-

gebnisse. Das Pellet wurde in obigem Tris Puffer geringer Ionenstärke wieder aufgenommen, im Potter homogenisiert und auf eine Extinktion $E_{1020}=50$ (1cm Küvetten) gebracht.

16.2. Spheroplasten (=rightside-out Partikel)

(modifiziert nach Michels und Konings, 1978)

Geerntete Bakterien wurden w.o. in Tris Puffer homogenisiert. Anschließend wurde 0,5mg/ml Lysozym und 5.5mM EDTA zugegeben und etwa 3h bei RT gerührt (Tanaka, 1983). Es ist unbedingt nötig, die Bildung der Partikel mikroskopisch zu verfolgen (deutliches Aufblähen). Anschließend wurde die Suspension zweimal je 1 Minute ins Ultraschallbad gestellt; daran schloß sich, wie bei der Darstellung von Chromatophoren erst eine Niedrig- und dann eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation. Auch hier wurde die wieder homogenisierte Lösung auf $E_{1020} = 50$ (1cm Küvetten) eingestellt.

17. Dissoziation der Chromatophore

Zu einer Chromatophorensuspension ($E_{1020}=50$, s.o.) wurde 1% Triton X-100 gegeben und die Lösung über Nacht gegen TX-Puffer (10mM Tris, 0,1% Triton X-100, pH=7,5) bei 4°C dialysiert; das Dialysat wurde auf eine Ionenaustauscher Säule (DE 52) aufgetragen, die vorher mit TX-Puffer equilibriert worden war. Mit steigender NaCl Konzentration ließen sich zwei gefärbte, proteinhaltige Fraktionen von der Säule eluieren, die anschließend wieder gegen TX-Puffer dialysiert wurden.

18. Kontrollierte Proteolyse von Membranpartikeln

Zu 500µl der Membranpartikel (Chromatophore bzw. Spheroplasten) wurden jeweils steigende Mengen verschiedener Proteasen gegeben und die Proben 1h lang bei RT geschüttelt. Im folgenden sind die verwendeten Enzyme mit den "Stopreagentien" angegeben:

Proteinase K ----- gesättigte PMSF Lösung
 Trypsin ----- Trypsininhibitor (400mg/ml)
 Thermolysin ----- EDTA (1M)

Die Proben wurden mit dem Stopreagens und 10mM Tris Puffer auf 1,5ml aufgefüllt und in der Laborzentrifuge abzentrifugiert (25000g). Das Pellet wurde anschließend noch drei Mal mit Tris Puffer gewaschen und dann auf das ursprüngliche Volumen (500ml) aufgefüllt. Diese Proben standen nun für die Gelelektrophorese zur Verfügung.

19. SDS - Gelelektrophorese von Membranproteinen

Um einmal die Peptidzusammensetzung und zum anderen die Reinheit von isolierten Proteinfractionen zu bestimmen, wurde eine SDS - Gelelektrophorese (SDS - PAGE) durchgeführt (modifiziert nach Lämmli, 1970). Gute Ergebnisse wurden mit einem Gradientengel (11,5 - 16,5% Acrylamid) erzielt (Cogdell et al, 1980). Als Inkubationspuffer diente der "normale" Lämmli-Proben-Puffer. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Trenngel: Gradientengel von 11,5-16,5% Acrylamid

	11,5%	16,5%
1,0M Tris, pH=8,8	7,5ml	7,5ml
SDS (10%ig)	0,2ml	0,2ml
Acrylamid (30%ig)	7,74ml	11,1ml
TMED (5%ig)	0,2ml	0,2ml
H ₂ O bid.	4,1ml	0,8ml
Persulfatlösung (15%ig)	0,3ml	0,2ml

Obergel (3% Acrylamid):

1,0M Tris, pH=6,8	2,5ml
H ₂ O bid.	15,0ml
SDS (10%ig)	0,2ml
Acrylamid (30%ig)	2,0ml
TMED (5%ig)	0,2ml
Persulfat (15%ig)	0,4ml

Apparatur: 10x10cm Platten

Probenvorbereitung:

15µl Chromatophore ($E_{1020}=50$; 1cm Küvetten) und 85µl Tris Puffer und 100µl Inkubationspuffer wurden zusammengegeben und davon jeweils 100µl aufgetragen. Es empfiehlt sich die Elektrophorese bei konstanter Spannung (70-84V) über Nacht bei RT laufen zu lassen (ca. 14h). Mit Comassieblau lassen sich die Banden sichtbar machen (Lämmli, 1970).

Um die Molekulargewichte der Reaktionszentren und der Antennenproteine abschätzen zu können, wurde ein Standardset globulärer, hydrophiler Proteine mit aufgetragen. In der Mischung waren dabei folgende Proteine vorhanden (in Klammern dahinter die jeweiligen MWGs in kDa): Rinderserum Albumin (66,0), Hühnerei Albumin (45,0), Lactoglobulin (18,4 oder 36,8), Pepsin (34,7) Trypsinogen (24,0) und Lysozym (14,4). Alternativ und ergänzend wurden auch hydrophobe Peptide bekannter Größe als Standards verwendet.

Die densitometrische Auswertung der Gele erfolgte an einem Gerät Typ TLD 100 der Fa. Vitatron.

20. Photochemie von Bakteriochlorophyll b

Das Pigment wurde dazu in Aceton oder anderen Lösungsmitteln gelöst und mit weißem Licht einer Halogenlampe bestrahlt (20 mW/cm²). Die Reaktion konnte spektrometrisch verfolgt werden (Abnahme der 792nm Absorption von Bchl b, Zunahme einer neuen Bande um 680nm).

21. Anaerobe Photoreaktion

In einer Hochvakuumapparatur wurde Ether durch mehrmaliges Einfrieren, Pumpen und Überdestillieren O₂ frei gemacht. Anschließend wurde darin im Hochvakuum Bchl b aufgelöst, welches sich in einem Seitenarm befand. Dieser ist so gestaltet, daß darin Spektren aufgenommen werden konnten. Die Lösung wurde nun saturierend bestrahlt, bis keine Absorptionsbande bei 794nm mehr vorhanden war.

22. Oxidation von Limonen

Bchl b ($E_{790}=1.0$; 1cm Küvetten) wurde in einer 0,1M Limonen Lösung in CCl_4 24h lang belichtet. Um auszuschließen, daß die gebildeten Oxidationsprodukte selbst $^1\text{O}_2$ bildeten, wurde bei der Belichtung ein 720nm Filter verwendet, sodaß also nur die langwellige Bchl b Bande Licht empfing und nicht Oxidationsprodukte, die ja alle um 680nm absorbieren. Die beleuchtete Lösung wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt und in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 2/7$ wieder aufgenommen; dazu wurde unter Eiskühlung eine stöchiometrische Menge Na_2SO_3 gegeben (bezogen auf die zugesetzte Limonenmenge) und über Nacht 12h lang gerührt. Nach Beendigung der Reduktion wurde die Lösung 2h lang auf 70°C erhitzt, die gebildeten Alkohole mit Hilfe von gesättigter NaCl Lösung in Ether überführt, getrocknet, einrotiert und in CH_2Cl_2 wieder aufgenommen. Die Mischung konnte so direkt ins GC injiziert werden.

Für die anschließende GC-Analyse stand ein GC Varian 1440 zur Verfügung.

Säule: Polypropylenglycol Glaskapillarsäule (50m)

Temperatur: 140°C

Druck: 1,3 bar; Carrier: He

Strömung: 2ml/min

23. Elektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Dr. G. Wanner an einem Siemens Elmiskop 101 aufgenommen. Für die Untersuchungen wurden die verschiedenen Fraktionen auf Kupfernetzchen aufgebracht. Die Befilmung erfolgte entweder mit Collodium (in Butylacetat) oder mit aufgedampfter Kohle. Die Proben wurden mit 1%iger Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert.

Ergebnisse

Isolierung der Tetrapyrrolpigmente Bchl b haltiger Organismen

Durch Chromatographie auf handelsüblichem Puderzucker ließen sich Bchl b und seine Folgeprodukte relativ gut voneinander trennen. Dabei war es meist nicht nötig die PE-Elution durch stufenweise Erhöhung der n-Propanol Konzentration zu verbessern. In der Reihenfolge ihres Auftretens erschienen dabei bei E. halochloris folgende Produkte:

1. Carotinoide; dabei dürfte es sich hauptsächlich um Rhodopin oder das entsprechende Methoxiderivat handeln (Imhoff und Trüper, 1977; Schmidt, 1978).
2. Bchl b (gekennzeichnet durch ein langwelligstes Absorptionsmaximum bei 794nm).
3. Bchl b_{ox}. (zeigt demgegenüber ein langwelligstes Maximum um 680nm).
4. Ein bislang unbekanntes Pigment, das bis zuletzt auf der Säule blieb; dies ließ sich dann jedoch durch MeOH eluieren. Es ist zu bemerken, daß es oft nicht zufriedenstellend gelang Bchl b und Bchl b_{ox} zu trennen. Deshalb tauchten im Bchl b Spektrum öfters Peaks um 680nm auf, die auf Oxidationsprodukte zurückzuführen sind. Andererseits war deren Anteil sehr viel geringer, wenn darauf verzichtet wurde die Proben zuckerfrei zu waschen. Es wurde deshalb häufig dieser Weg gewählt um "reines" Bchl b zu erhalten.

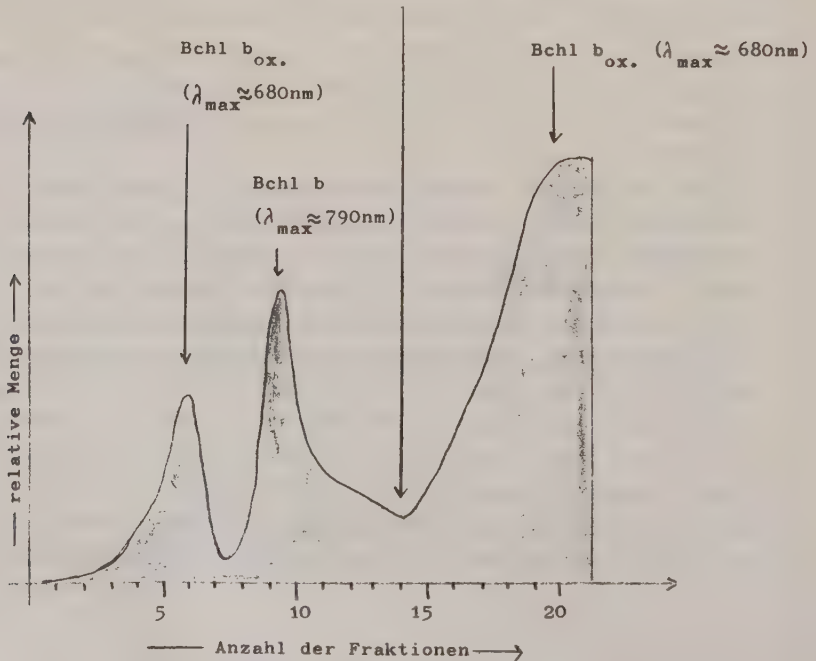
Chromatographie auf DEAE-Cellulose lieferte i.A. gute Ergebnisse bei der Abtrennung von Bchl a und Bchl a_{ox}. (Gottstein und Scheer, 1983; Gottstein, 1984). Mit Bchl a_{ox} ist in diesem Fall das 10-Hydroxybchl a (10-OH-Bchl a) gemeint welches sich leicht durch Oxidation mit O₂ bilden kann (Hynninen, 1981). Beide Substanzen ließen sich spektroskopisch nicht unterscheiden, da die 10-OH Gruppe auf die Absorption keinen Einfluß hat; eine Trennung war jedoch auf RP-HPTLC Platten möglich (System: 6; s.S. 12). Bchl b und Bchl b_{ox} ließen sich auf diese Weise nicht trennen, im Gegenteil, das System eignete sich für die empfindliche exocyclische Doppelbindung des Bchl b (Scheer et al, 1974; Steiner, 1980) nicht, da reines Bchl b während des

Säulendurchgangs oxidiert wurde (langwelligstes Absorptionsmaximum nur noch um 680nm).

Im Gegensatz dazu ließ sich Bchl b sehr rein erhalten, wenn man sich der Chromatographie auf Sepharose zuwendet (s.S. 10). Die eingesetzte Bchl b Lösung zeigte ein 794/680nm Verhältnis von 1/1. D.h. jedoch, daß von den tatsächlichen Mengen etwa 1/3 mehr Oxidationsprodukt in der Probe vorlag, da dessen Extinktionskoeffizient nur etwa 2/3 so groß ist, wie derjenige von Bchl b (Steiner, 1980).

Als erstes kam dabei oxidiertes Bchl b von der Säule ($\lambda_{\max} \approx 680\text{nm}$), anschließend erschien sehr sauberes Bchl b ($\lambda_{\max} \approx 790\text{nm}$); ein letzter Rest Pigment konnte auch durch steigende n-Propanol Konzentration nicht mehr eluiert werden. Deshalb wurde versucht die Hydrophilität des Elutionsmittels durch Zugabe von Aceton zu erhöhen. Auf diese Weise erhielt man jedoch nur noch oxidiertes Bchl b, was aufgrund der Instabilität dieser Substanz gerade in Aceton verständlich ist (Steiner, 1980). Das folgende Fraktionierungsschema veranschaulicht dies. Als Elutionsmittel diente dabei bis Fraktion 14 PE/2-Propanol = 20/1.

ab hier wurde Aceton zugegeben



PROTOPORPHYRIN-IX EIN AUSSCHIEDUNGSPRODUKT DES Bchl b HALTIGEN BAKTERIUMS E. HALOCHLORIS

1. Problemstellung und Einführung

Alle bislang bekannten Zwischenstufen und Biosyntheseschritte von Bchl wurden an Bchl a haltigen Organismen wie *Rp. sphäroides*, *Rsp. rubrum* oder *Rp. capsulata* (Jones, 1978 als Übersichtsartikel) untersucht. Die Biosynthese verläuft über eine Reihe von Zwischenstufen, die im wesentlichen denen der Chl a Biosynthese entsprechen (Schneider, 1975; Adler et al, 1979; Benz, 1980). In letzter Zeit war es dann möglich, durch die spektroskopische Verbesserung in der ODMR Technik (Beck et al, 1983) diese Vorstufen des Bchl a in ganzen Bakterien durch ihr Fluoreszenzverhalten zu charakterisieren (Beck und Drews, 1983). Interessant ist es jetzt, diese Techniken auf Bchl b haltige Organismen, also etwa auf *Rp. viridis* oder *E. halochloris* anzuwenden (Angerhofer, pers. Mitt.).

In dieser Beziehung war folgende Beobachtung von Interesse: Ganze Zellen des Bchl b haltigen Bakteriums *E. halochloris* zeigten, im Starklicht gewachsen, häufig eine intensive Rotfärbung. Da diese nicht von Carotinoiden stammte, wie eine spektroskopische Analyse ganzer Zellen zeigte, wurde versucht diesen roten Farbstoff zu isolieren und näher zu charakterisieren.

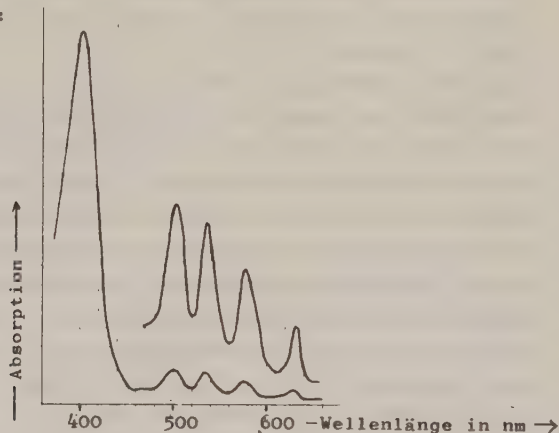
2. Isolierung und Reinigung

Beim Abzentrifugieren der Bakterien (s.S. 9) blieb dieser rote Farbstoff zum Teil im Medium, aber auch das Pellet war häufig rot gefärbt - auch noch nach dem Waschen mit Tris Puffer. Es wurde ebenfalls bereits erwähnt (s.S. 21), daß bei der Pigmentreinigung auf einer Zuckersäule dieses Pigment als polarste, mit n-Propanol nicht mehr eluierbare Fraktion auf der Säule blieb. Diese ließ sich erst mit reinem MeOH eluieren. Eine Reinigung gelang durch DC (System: 7). Da die Handhabung

solch polarer Substanzen evtl. problematisch sein kann, wurde nach 7 (s.S. 13) die Verbindung verestert und als Referenzsubstanz nach 9.2 (s.S. 14) Protoporphyrin-IX-dimethylester dargestellt.

3. Charakterisierung und Identifizierung

In der folgenden Abb. ist das Absorptionsspektrum dieser Verbindung dargestellt:



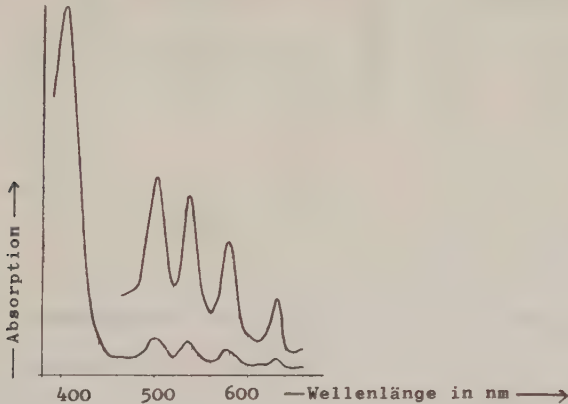
632	576	532	504	406	max. Absorption in nm
0.041	0.061	0.087	0.092	1.0	A_{λ}/A_{406}

Die hohe Absorptionsbande im UV und die ungefähr zehnfach kleineren Banden im sichtbaren Bereich wiesen auf ein Porphyrin hin. Kennzeichnend sind jedoch v.a. die Banden zwischen 500 und 650nm (Smith, 1975). Ein spektroskopischer Vergleich mit 1. etio-, 2. rhodo-, 3. oxorhodo- und 4. phyllo-type ließ eine Zuordnung zum etio-type gerechtfertigt erscheinen. Dieser Vergleich lieferte schon einen starken Hinweis auf Protoporphyrin-IX, sodaß die folgende Charakterisierung auf einen spektroskopischen und chromatographischen Vergleich der aus E. halochloris gewonnenen Probe und der aus Hämin isolierten Referenzsubstanz (s.S. 14) hinauslief.

3.1. Spektroskopischer Vergleich

3.1.1. Absorptionsspektroskopie

In der Abb. der letzten Seite war bereits das Absorptionsspektrum des aus *E. halochloris* gewonnenen Produkts abgebildet. Im folgenden nun das uv-vis Spektrum der Referenzsubstanz:



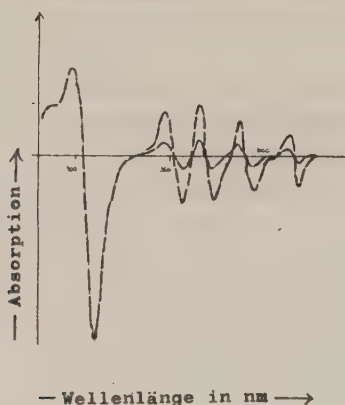
630	578	533	502	404	max. Absorption in nm
0.045	0.070	0.090	0.10	1.0	A_{λ}/A_{630}

Im Rahmen der spektrophotometrischen Genauigkeit sind beide Absorptionsspektren weitgehend gleich (s.u.).

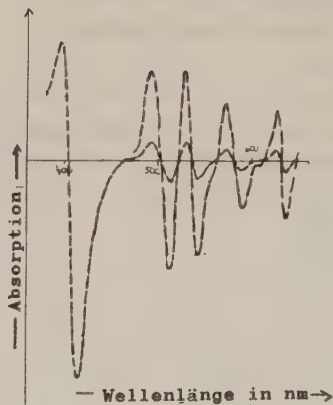
3.1.2. Derivativspektroskopie

Das Übereinstimmen der Absorptionen allein, ist noch kein sicheres Indiz für die Gleichheit zweier Spektren; wenn auch die Ableitungen identisch sind ist der Beweis sicherer. In der folgenden Abb. sind die ersten Derivativspektren beider Substanzen dargestellt:

Protoporphyrin-IX-dimethylester



E. halochloris - Methylester



Im folgenden sind die Absorptionsmaxima und die Nulldurchgänge angegeben:

E. halochloris - Methylester:

λ_{max} (nm): 634, 618, 590, 571, 542, 529, 511, 492, 414, 392.

Nullldurchgänge (nm): 631, 610, 578, 560, 532, 521, 502, 467, 406.

Protoporphyrin-IX-dimethylester:

λ_{max} (nm): 632, 622, 584, 568, 539, 526, 508, 488, 418, 395.

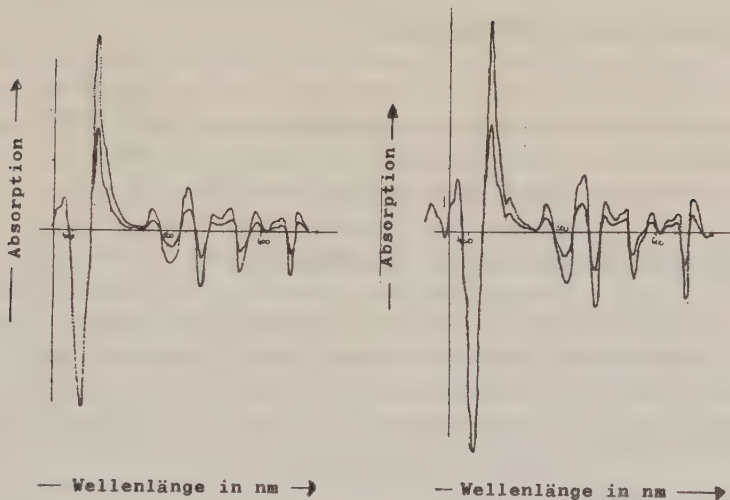
Nullldurchgänge (nm): 628, 608, 574, 547, 532, 517, 497, 460, 408.

Auch hier treten geringfügige Unterschiede auf, auf die jedoch unter 3.2.2. eingegangen wird.

Um noch exaktere Aussagen machen zu können, wurde von beiden Substanzen auch die 2. Ableitungen gemessen. Das folgende Bild zeigt die entsprechenden Spektren:

Protoporphyrin-IX-dimethylester

E. halochloris - Methylester



Im folgenden sind wieder die Absorptionsmaxima und die Nulldurchgänge angegeben:

E. halochloris - Methylester:

λ_{max} (nm): 640, 632, 624, 608, 594, 577, 572, 548, 534, 526,
508, 486, 428, 408, 390.

Nulldurchgänge (nm): 652, 636, 628, 590, 573, 554, 530, 512,
492, 414, 392.

Protoporphyrin-IX-dimethylester:

λ_{max} (nm): 638, 632, 621, 606, 592, 574, 568, 548, 532, 522,
502, 482, 428, 410, 390.

Nulldurchgänge (nm): 634, 628, 588, 572, 543, 529, 510, 491,
419, 396.

Sowohl die Absorptionsspektren, als auch deren 1. und 2. Ableitungen stimmen recht gut überein, zeigen auf der anderen Seite aber auch deutliche, wenn auch nur minimale Unterschiede. Deshalb wurden die beiden Substanzen auch chromatographisch verglichen.

3.2. Chromatographischer Vergleich

3.2.1. Dünnschichtchromatographie

Beide Substanzen wurden auf DC untersucht, und zwar sowohl auf normal-phase-HPTLC (System: 4; s.S. 12) als auch auf RP-HPTLC-Platten (System: 6; s.S. 12). In beiden Systemen zeigten die beiden Substanzen identisches Laufverhalten.

3.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Ein letzter und sicherer Beweis der Identität konnte durch HPLC geführt werden. Die Retentionszeit t ist eine spezifische Konstante für eine Substanz.

Laufmittelsystem: 89% MeOH, 11% einer wässrigen 1%igen Natrium-ascorbatlösung (System: 2; s.S. 11)

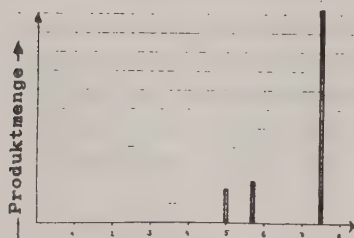
Detektion: 500nm

In der folgenden Tabelle sind die Retentionszeiten t , sowie die Volumenprozent der einzelnen Peaks angegeben. Dabei wurde jeweils die gesamte induzierte Menge gleich 100% gesetzt.

E. halochloris-Methylester	Protoporphyrin-IX-dimethylester	Retentionszeit t (min)
73.5%	100%	7.5
14.6%	----	5.7
11.9%	----	5.0

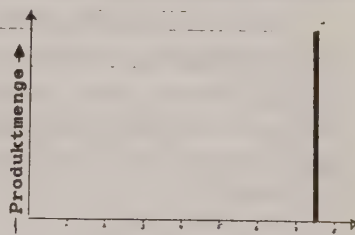
Die folgende Abb. zeigt das zugehörige Strichdiagramm:

E. halochloris Methylester



-Retentionszeit t (min) →

Protoporphyrin-IX-dimethylester



→ - Retentionszeit t (min)

4. Zusammenfassung und Diskussion

Aufgrund der oben angeführten Übereinstimmungen (Absorptionsspektroskopie, Derivativspektroskopie, DC, HPLC) zeigte sich, daß es sich bei der von *E. halochloris* ins Medium ausgeschiedenen und in den Zellen akkumulierten Substanz im wesentlichen um Protoporphyrin-IX handelte. Gleichzeitig sank unter diesen Bedingungen die Bchl b Ausbeute auf die Hälfte ab, die Bchl b Synthese wurde also nicht konsequent weitergeführt.

Aus den HPLC-Daten erkennt man, daß Protoporphyrin-IX zwar das Hauptprodukt von *E. halochloris* ist, daß zusätzlich aber noch zwei polarere Produkte auftreten. Dies mag auch der Grund dafür sein, daß es bei den spektroskopischen Daten geringe Differenzen gab (s.o.). Interessant ist v.a., daß der Organismus Protoporphyrin-IX ins Medium abgibt. Leider war eine Zuordnung zu bestimmten Kulturbedingungen bisher nicht sicher möglich. Die Anzuchttemperatur scheint jedenfalls nicht der entscheidende Faktor zu sein, da eine Veränderung derselben die Bildung nicht beeinflusste. Es kann jedoch angenommen werden, daß der Sauerstoffpartialdruck eine entscheidende Rolle spielt. So wurde bei verschiedenen Kulturen beobachtet, daß je größer der pO_2 ist, desto mehr Protoporphyrin-IX ausgeschieden wird. Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch *E. abdelmalekii* dieses Phänomen zeigte. Es könnte nun sein, daß während der Biosynthese von Bchl b in diesen Fällen eine Blockierung nach Protoporphyrin-IX eintritt, oder es wäre auch möglich, daß die Organismen einfach zuviel synthetisieren und es deshalb ins Medium abgeben.

UNTERSUCHUNG DER PIGMENTE VERSCHIEDENER, ANDERER BAKTERIENSTÄMME

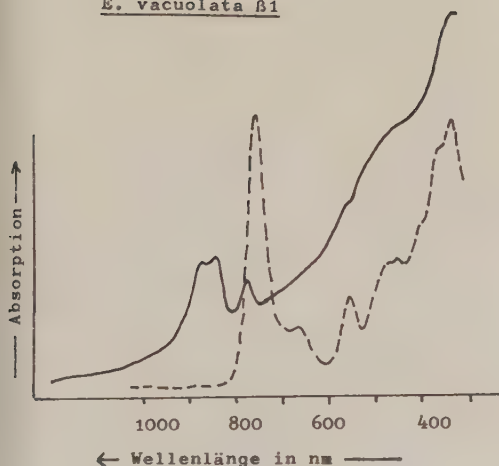
1. Einführung und Theorie

Das Bchl b haltige Bakterium *E. halochloris* ist, wie gezeigt werden konnte (Steiner et al, 1981), mit dem ungewöhnlichen 2,10-THGG verestert. Neben *E. halochloris* gibt es noch eine zweite *Ectothiorhodospira* Species aus dem gleichen Biotop (Trüper und Imhoff, 1982), nämlich *E. abdelmalekii* (Imhoff und Trüper, 1981). Auf der anderen Seite sind eine ganze Reihe Bchl a haltiger *Ectothiorhodospiraceen* bekannt (Imhoff et al, 1979; Imhoff et al, 1981; Trüper, 1968; Raymond und Sistrom 1967; 1969), deren Alkoholkomponenten noch nicht untersucht wurden. Damit stellt sich die Frage, ob dieser Alkohol für alle *Ectothiorhodospiraceen* charakteristisch ist, oder ob es es sich bei *E. halochloris* um eine Ausnahme handelt. Gleichzeitig wurden auch von einer Reihe anderer Bakterien die Pigmente in dieser Richtung hin untersucht, da für diese bisher keine gute Charakterisierung vorlag. So standen auch *Rsp. salexigens* (Drews, 1981), *Rsp. salinarum*, *Rp. marina* (Imhoff, 1983), *Rp. sulfidophila* (Hansen und Veldkamp, 1973) und *Rp. gelatinosa* (Biebl und Drews, 1969) zur Verfügung. Methanolextrakte ganzer Bakterien lassen sich direkt ins HPLC injizieren, sodaß auf diese Weise ein schneller Überblick über die jeweilige Pigmentzusammensetzung erhalten werden konnte. Als Standart diente Bchl a_p aus *Rp. sphäroides*.

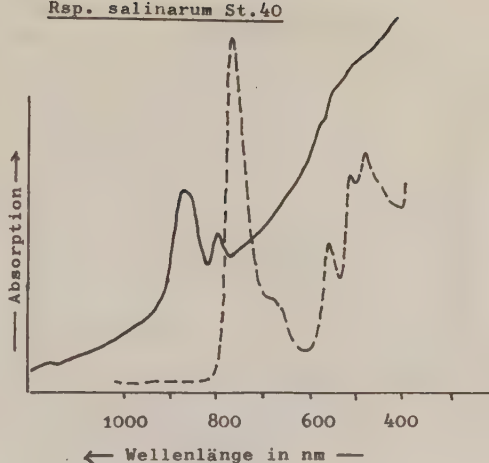
2. Absorptionsspektroskopie

Von allen oben angeführten Bakterien wurden a. in vivo Absorptionsspektren ganzer Zellen und b. solche der Methanolextrakte angefertigt. Im folgenden sind diese Spektren abgebildet:

E. vacuolata B1

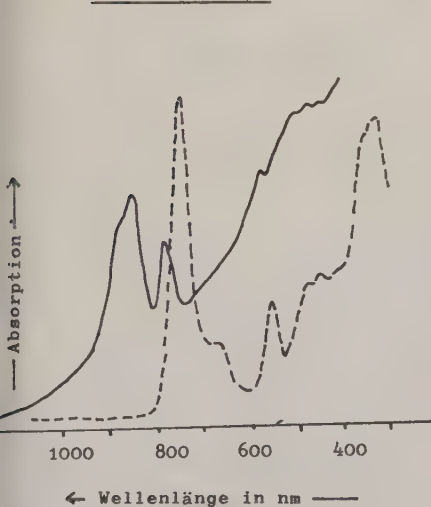


Rsp. salinarum St.40

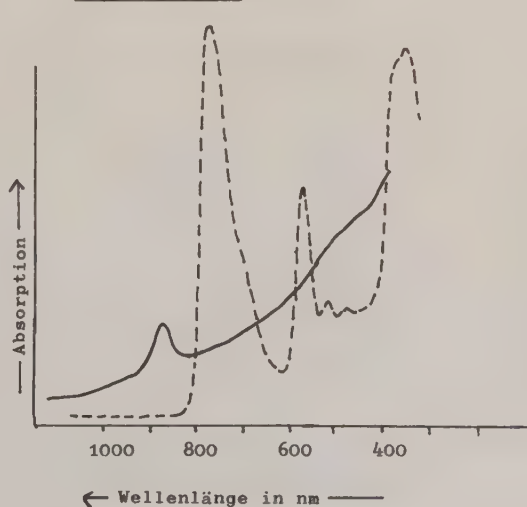


Die ausgezogenen Kurven geben hier, wie auf der folgenden Seite die Absorptionsspektren ganzer Zellen, die gestrichelten die der extrahierten Pigmente wieder (LM: Ether).

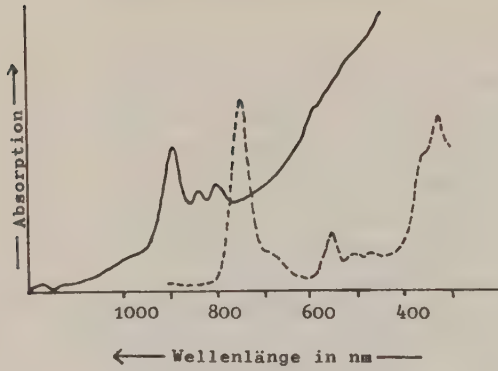
E. mobilis 81/2



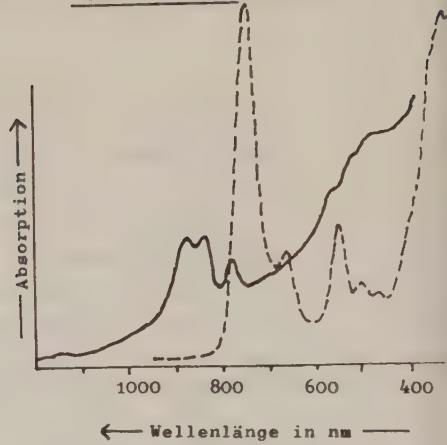
Rp. marina 985



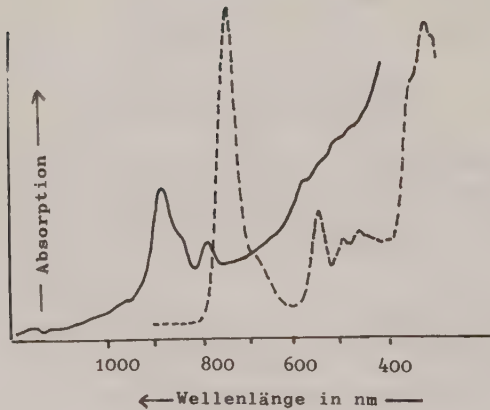
Rsp. sallexigens



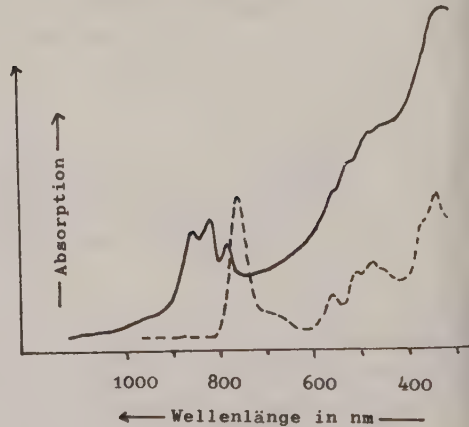
E. mobilis 51/7



E. halophila 51/3



E. halophila 51/1



Alle in vivo Absorptionen deuten auf Bchl a hin (Absorptionsmaximum der Antenne). Auch die extrahierten Pigmente, die ein langwelligstes Maximum um 770nm zeigen unterstützen diesen Befund. Deutliche Unterschiede treten zwischen 400 und 500nm auf, was auf den unterschiedlichen Carotinoidgehalt und die verschiedenartige Carotinoidkomposition zurückzuführen ist. Eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter um 680nm weist auf ein Oxidationsprodukt von Bchl a, nämlich 3-Devinyl-3-acetylchl a hin (Smith und Calvin, 1966; s.S. 13).

3. HPLC-Versuche an den extrahierten Pigmenten

Verwendet wurde sowohl die RP8 Säule (System 4, s.S. 11) als auch die RP18 Säule (System 1, s.S. 11). Detektiert wurde a. bei 600nm (Absorptionsmaximum von Bchl a) und b. bei 675nm (Absorptionsmaximum von Bchl a Oxidationsprodukten; s.o.). Mit den oben angegebenen Bedingungen ließ sich Bchl a sehr gut im HPLC trennen. Bei allen Proben tauchte nach 12.8min (RP 8 Säule) bzw nach 12.4min (RP 18 Säule) ein Hauptpeak auf, der mit Hilfe eines Bchl a_p Standards aus Rp. sphäroides als Bchl a_p identifiziert werden konnte. Weitere, schnellere Produkte, die v.a. beim mehrmaligen Injizieren der gleichen Probe erschienen, deuten auf eine beginnende Oxidation hin (10-OH-Bchl a bildet sich in MeOH relativ leicht (Brereton et al, 1980). Schneller würden im HPLC aber auch am Alkohol modifizierte Bchle erscheinen (Steiner et al, 1982). Eine exakte Zuordnung war auf dieser Stufe also noch nicht möglich. Deshalb wurden von den fraglichen Proben Methylphäophorbide dargestellt (s.S. 13) und diese erneut injiziert (Laufmittelsystem 5, s.S. 12). Da, abgesehen von einer generellen Rf-Wert Erhöhung, das Muster der Peaks nach der Umesterung identisch mit dem der Phytylester war, konnte zurückgeschlossen werden, daß es sich (Steiner et al, 1982) bei den schnelleren Produkten tatsächlich um Oxidationsprodukte handelte und nicht um in der Alkoholkomponente modifizierte Bchle. Alle oben angegebenen Bchl a enthaltenden Bakterien sind also ganz "gewöhnlich" mit dem einfach ungesättigten Isoprenoidalkohol Phytol verestert.

4. Untersuchung des Pigments von E. abdelmalekii

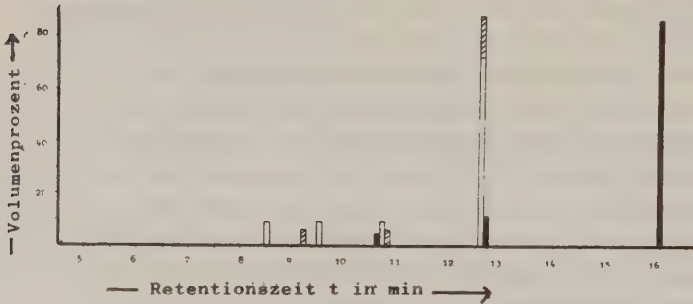
Bchl b ließ sich aus *E. abdelmalekii* nach der Methode von Strain und Svec (1966) isolieren und wie oben beschrieben aufreinigen (s.S. 10). Als Vergleich diente einmal Bchl b_p aus *Rp. viridis* (mit Phytol verestert), zum anderen Bchl $b_{2,10}$ -THGG aus *E. halochloris* (mit 2,10-THGG verestert).

4.1. Vergleich im HPLC

Im folgenden ist das HPLC Strichdiagramm der isolierten Bchle angegeben:

System: 91% MeOH, 9% einer wässrigen, 1%igen Na-ascorbatlg

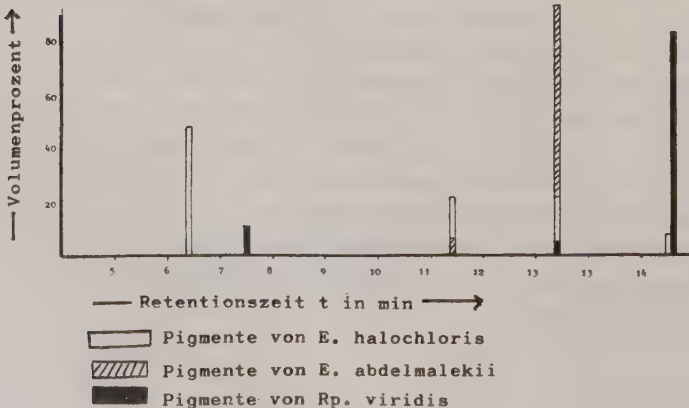
Detektion: 580nm (s.S. 11)



Ebenso lassen sich die nach S. 13 dargestellten Bphe im HPLC untersuchen:

System: 94% MeOH, 6% einer wässrigen, 1%igen Na-ascorbatlg

Detektion: 530nm (s.S. 11)



Diese HPLC Versuche wurden in den folgenden Tabellen noch einmal zusammengefaßt. Angegeben sind jeweils die Retentionszeit t in min, sowie in Klammern die Volumenprozent (der Gesamtpigmentgehalt wurde dabei gleich 100% gesetzt).

Bchl b aus:

Rp. viridis	E. halochloris	E. abdelmalekii
10.6 (3.2%)	8.5 (9.1%)	9.2 (6.4%)
12.7 (10.8%)	9.5 (9.1%)	10.8 (5.1%)
16.0 (85.9%)	10.7 (9.1%)	12.8 (88.5%)
	12.6 (72.7%)	

Injiziert man das Bchl b aus E. halochloris und E. abdelmalekii gleichzeitig übereinander, so zeigten sich nur noch zwei Peaks nach 10.8 und 12.8 min.

Ebenso lassen sich auch die aus Bphe b erhaltenen Ergebnisse tabellarisch erfassen:

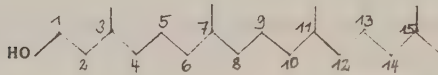
Bphe b aus:

Rp. viridis	E. halochloris	E. abdelmalekii
7.5 (11.2%)	6.4 (21.7%)	11.4 (5.9%)
13.4 (4.5%)	11.4 (21.7%)	13.4 (94.1%)
15.6 (84.3%)	13.4 (48.4%)	
	15.4 (8.2%)	

Nimmt man eine Totzeit von 2 Minuten an, so lassen sich durch einen konstanten Faktor von 1,32 (Steiner et al, 1982) zugehörige Substanzen zuordnen. Legt man diesen Faktor zugrunde, so erscheint Bchl b_p aus Rp. viridis nach 16.0min, das entsprechende Bchl $b_{2,10}$ -THGG aus E. halochloris nach 12.6min. Wie man jedoch schon aus den bloßen Retentionszeiten erkennen kann, decken sich die Peaks von E. halochloris und E. abdelmalekii zum großen Teil. Die auftretenden Unterschiede dürften auf einen unterschiedlichen Anteil von Oxidationsprodukten des Bchl b zurückzuführen sein. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß auch E. abdelmalekii Bchl b enthält, das mit 2,10-THGG verestert ist.

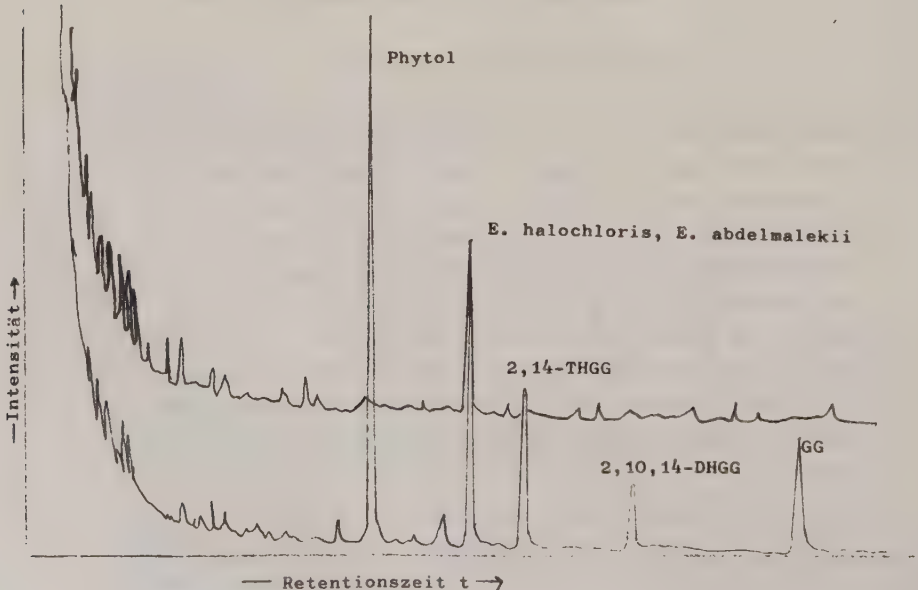
4.2. Vergleich im GC

Der durch Verseifung isolierte Alkohol aus *E. abdelmalekii* (s.S. 13) wurde, nach Reinigung auf DC (Steiner, 1980), gaschromatographisch untersucht und a. mit dem aus *Rp. viridis* gewonnenen Phytol, b. mit dem aus *Chlorobium limicola* isolierten 2,6-THGG (Caple et al, 1978), sowie c. mit einem aus ergrünenden Pflanzen isolierten Alkoholgemisch (Benz, 1980), das bei der Chlorophyllbiosynthese eine Rolle spielt und nicht zuletzt d. mit dem aus *E. halochloris* gewonnenen 2,10-THGG (Steiner et al, 1981) verglichen. Im folgenden sind die Strukturen dieser Vergleichssubstanzen angegeben:



- △ 2 : Phytol (*Rp. viridis*, grüne Pflanzen)
- △ 2,14-THGG : ergrünende Pflanzen (Schoch und Schäfer, 1978)
- △ 2,10-THGG : *E. halochloris* (Steiner et al, 1981)
- △ 2,6-THGG : *Chlorobium limicola* (Caple et al, 1978)
- △ 2,10,14-DHGG : ergrünende Pflanzen (Benz, 1980)
- △ 2,6,10,14 : GG; ergrünende Pflanzen; *Rsp. rubrum* (Benz, 1980; Katz et al, 1976).

Die folgende Abbildung zeigt das GC (Bedingungen s.S. 14):



Injiziert man den Alkohol von *E. halochloris* und den von *E. abdelmalekii* gemeinsam, so taucht nur ein einziger Peak auf (Retentionszeit: 34,6 min; Säule: SP 1000).

5. Zusammenfassung und Diskussion

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse ließ sich schließen, daß *E. abdelmalekii*, ebenso wie *E. halochloris* mit dem ungewöhnlichen 2,10-THGG verestert ist. Bei den Bchl a enthaltenden *Ectothiorhodospiraceen* kommt hingegen nur Phytol vor. Als ungewöhnlich wird der Alkohol deshalb bezeichnet, weil man ein anderes "Hydrierungssystem" als bei grünen Pflanzen zugrunde legen muß.

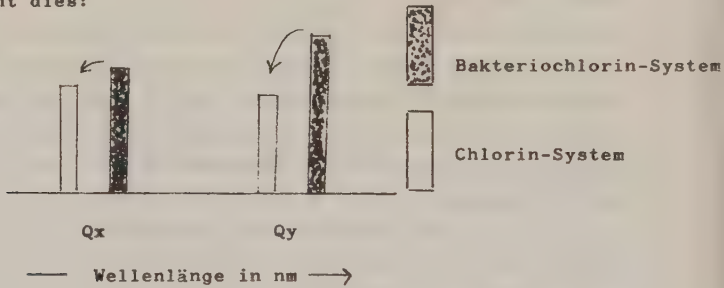
Bei der Chlorophyll Biosynthese verestert als erstes GG mit dem Makrozyklus (Benz, 1980). Nacheinander werden dann die Doppelbindungen in Position 6, 10 und 14 hydriert, die an C_2 bleibt im Phytol erhalten. Man kann diese Reihenfolge dadurch rationalisieren, wenn man davon ausgeht, daß das Chlorophyll Ringsystem in einer hydrophilen Tasche sitzt in der auch noch die erste Doppelbindung des Isoprenoidalkohols (nach C_2) Platz findet. Der hydrophobe Rest schaut dann nach außen.

Bei der Chlorophyll Biosynthese nimmt man nun an, daß ein hydrierendes Enzym, beginnend am Alkoholanfang nach "außen" entlangläuft, GG schrittweise hydriert bis Phytol gebildet ist. Sowohl bei *Chlorobium limicola*, als auch bei den beiden Bchl b enthaltenden *Ectothiorhodospiraceen* muß man dieses Modell fallen lassen, weil nicht einzusehen ist, daß nach C_6 die Bindung hydriert ist, die Doppelbindung nach C_{10} jedoch bestehen bleibt. Man könnte etwa daran denken, daß sich in der Alkoholkomponente eine Schleife bildet, sodaß die Doppelbindung nach C_{10} einer Hydrierung nicht mehr zugänglich ist.

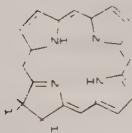
PHOTOOXIDATION VON BAKTERIOCHLOROPHYLL B

1. Einführung

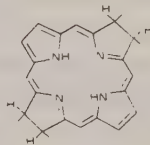
Es wurde bereits auf die Instabilität von Bchl b in organischen Lösungsmitteln hingewiesen (Brockmann und Kleber, 1972; Scheer et al, 1974; Steiner, 1980). Zurückzuführen ist diese Instabilität auf die exocyclische Doppelbindung zwischen C₈ und C₈₁. Diese kann leicht isomerisieren; dabei entsteht aus einem Bakteriochlorin ein Chlorin Gerüst. Spektroskopisch läßt sich dies daran verfolgen, daß sowohl die Qy-Bande als auch die Qx-Bande kurzwellig verschoben werden. Das folgende Schema veranschaulicht dies:



Von der Konjugation kommt im Chlorin System der Ring B hinzu, der Makrozyklus besteht dann also aus drei vollständig ungesättigten Pyrrolringen, wohingegen im Bakteriochlorin System der Ring B hydriert ist.



Chlorin-System



Bakteriochlorin-System

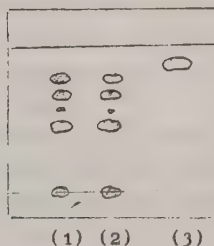
Die Literatur zur Chemie des Bchl b ist widersprüchlich. Brockmann und Kleber beschrieben das Isomerisierungsprodukt 3-Devinyl-3-acetylchl a. Andererseits fanden Scheer et al. verschiedene Produkte von denen keines 3-Devinyl-3-acetylchl a war. Dieser Befund wurde auch in meiner Zulassungsarbeit (1980) bestätigt. Es ließen sich immer mindestens drei Produkte bei der Belichtung vom Bchl b nachweisen (unter aeroben Bedingungen s.u.). Im folgenden sollte deshalb die Reaktion unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden und zum anderen sollten die Oxidationsprodukte näher charakterisiert und identifiziert werden.

2. Vergleich der Oxidation mit DDQ und der Oxidation durch Licht

Behandelt man Bchl a mit DDQ so entsteht 3-Devinyl-3-acetylchl a in spektroskopischer und dünnschichtchromatographisch quantitativer Ausbeute (Smith und Calvin, 1966). Sowohl bei der Oxidation von Bchl b mit DDQ, als auch bei der Bestrahlung einer acetonischen Lösung mit Licht erhält man dagegen Produkte, die zwar ebenfalls um 680nm langwelligst absorbieren, die aber nach DC nicht mit 3-Devinyl-3-acetylchl a identisch sind. Diese Produkte sollen nun im folgenden verglichen werden.

2.1. Dünnschichtchromatographischer Vergleich

Auf einer HPTLC Platte wurde einmal 3-Devinyl-3-acetylphä a und zum anderen die entmetallierten, durch DDQ bzw. durch Licht erhaltenen Produkte von Bchl b aufgetragen. (System 1, s.S. 12).



- (1) durch Licht oxidierte Phäophytine aus Bchl b
(2) durch DDQ oxidierte Phäophytine aus Bchl b
(3) 3-Acetyl-3-devinylphäophytin a

Obwohl die Absorptionsspektren der Verbindungen recht ähnlich sind (Steiner, 1980), handelt es sich bei (1) und (2) um deutlich polarere Produkte. Zum zweiten fällt jedoch auf, daß durch DDQ aus Bchl b nach DC Analyse die gleichen Produkte entstehen wie nach der Bestrahlung mit Licht.

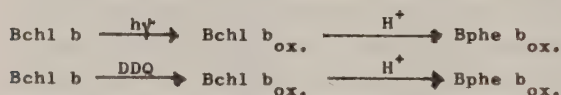
2.2. Vergleich durch HPLC

Auch durch HPLC ließen sich die beiden unterschiedlich erhaltenen Oxidationsprodukte vergleichen.

Laufmittel: 94% MeOH, 6% einer wässrigen, 1%igen Na-ascorbatlg

Detektion: 675nm (System 3; s.S. 11)

Schematisch sei vorher noch einmal die Bildung beider Gemische skizziert:



Sowohl bei Bchl b_{ox.}, als auch bei Bphe b_{ox.} handelt es sich dabei jedoch um Gemische verschiedener Substanzen. In der folgenden Tabelle sind nun die HPLC Daten dieser beiden Gemische angegeben:

belichtete Probe	Retentionszeit t (min)	Volumenprozent
	5.8	23.4%
	7.8	37.2%
	12.0	3.1%
	13.6	36.3%
DDQ behandelte	7.8	70.6%
Probe	12.0	11.8%
	13.6	17.6%

Wie man erkennen kann, entstehen durch beide Behandlungen weitgehend Produkte mit gleichen R_f Werten, wenn auch die Ausbeuten unterschiedlich sind.

3. Lösungsmittelabhängigkeit der Photooxidation

Es wurde bereits erwähnt, daß die Stabilität von Bchl b gegenüber Licht stark vom Lösungsmittel abhängt (Steiner, 1980). Bchl b wurde deshalb in folgenden Lösungsmitteln gelöst und solange bestrahlt, bis im Absorptionsspektrum nur noch ein Maximum um 680nm auftrat: MeOH, CHCl_3 , Benzol, Ethanol, CCl_4 , Hexan, Ether, Aceton.

3.1. Dünnschichtchromatographie

Auf RP-HPTLC Platten ließen sich sowohl die freien Bakteriochlorophylle, die durch Licht oxidiert worden waren (System 6; s.S. 12), als auch auf normal-phase HPTLC Platten die zugehörigen Phäophytine (System 1; s.S. 12) vergleichen. In allen Fällen erhält man die schon auf S. 39 beobachtete Bandierung von drei Hauptprodukten. Auch hier ließ sich nie das reine Umlagerungsprodukt 3-Devinyl-3-acetylchl a bzw. das entsprechende Phäophytin nachweisen.

3.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die in den verschiedenen Lösungsmitteln gewonnenen Photooxidationsprodukte ließen sich auch im HPLC überprüfen. Es wurde das gleiche System, wie bereits auf S. 40 erwähnt, angewendet. Auch hier erhielt man in allen Fällen drei Hauptpeaks, die den bereits auf S. 40 erwähnten entsprachen. Dabei tauchten immer deutlich zwei Hauptprodukte nach 7.8 bzw. 13.6min auf. Das schnellere Produkt nach 5.8min war meist nur mit weniger als 10% vertreten, und bei Hexan, CCl_4 und Benzol als Lösungsmittel nicht mehr nachweisbar, obwohl man es auf der DC noch erkennen konnte.

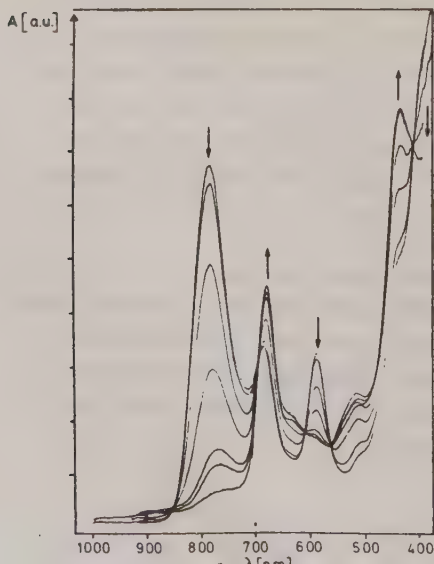
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich in allen getesteten Lösungsmitteln die gleichen drei Oxidationsprodukte, wenn auch, wie gesehen, in unterschiedlicher Verteilung, bilden. D.h. man kann eine direkte Beteiligung des Lösungsmittels auf die Photooxidation ausschließen (etwa eine Michael-Addition an die exocyclische Doppelbindung).

4. Kinetik der Photooxidation von Bchl b in Abhängigkeit vom Lösungsmittel

Auch Bchl a kann leicht oxidiert werden. Dabei entstehen v.a. zwei Produkte, nämlich einmal 3-Devinyl-3-acetylchl a (Smith und Calvin, 1966), zum anderen bildet sich aber leicht das Allomere, also 13^2 -OH-Bchl a (Brereton et al, 1980). Die Stabilität von Bchl a in verschiedenen Lösungsmitteln scheint vom Koordinationszustand des Moleküls abhängig zu sein (Brereton und Sanders, 1983; 1 und 2). So ist es davon abhängig, ob nur ein Ligand am zentralen Mg sitzt (KZ = 5), etwa in Aceton oder Ether, oder ob das Mg 6-fach koordiniert ist, wie in Pyridin oder MeOH. Die oktaedrische Koordination scheint das Molekül vor der Oxidation an C_{13}^2 zu schützen. Auch beim Bchl b war es möglich durch geeignete Wahl des Lösungsmittels die Oxidation zurückzuhalten. Deshalb wurde Bchl b in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst, und die Oxidation in Abhängigkeit der Beleuchtungszeit spektroskopisch am Auftreten einer neuen Bande um 680nm verfolgt (s.S. 19).

4.1. Spektroskopische Verfolgung der Photooxidation

Das folgende Absorptionsspektrum gibt als Beispiel die Verhältnisse wieder, wie sie in $CHCl_3$ als Lösungsmittel erhalten werden:



Die Pfeile geben an, ob ein Peak verschwindet oder neu entsteht.

Man erkennt deutlich die Abnahme der 792nm Absorption und ebenfalls die der zugehörigen Qx-Bande bei 578nm. Gleichzeitig steigt die Absorption im 680nm Bereich und die Soretbande verschiebt sich langwelliger nach 442nm. Isosbestische Punkte tauchen bei 692, 612, 560 und 412nm auf.

4.2. Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Da es sich bei den gebildeten Produkten um ein Gemisch handelt, lassen sich an dieser Stelle nur die Extinktionskoeffizienten für dieses Gemisch angeben:

37.800 (680nm), 71.200 (442nm), 39.700 (386nm).

4.3. Bestimmung der Halbwertszeiten

Es konnte bereits gezeigt werden (Steiner, 1980), daß Bchl b in Ether sehr viel stabiler ist als in Aceton. Trägt man den Logarithmus der prozentualen Abnahme der 790nm Bande gegen die Beleuchtungszeit t in min auf, so erhält man eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die Stabilität des Pigments im entsprechenden Lösungsmittel ist. In der folgenden Tabelle sind die Halbwertszeiten dieser Umwandlung angegeben, also die Zeiten, nach denen nur noch die Hälfte der ursprünglichen Bchl b Menge vorhanden war. Da leicht einzusehen ist, daß die Bildung der Photooxidationsprodukte auch konzentrationsabhängig ist (weniger konzentrierte Lösungen werden schneller oxidiert als konzentriertere) wurde darauf geachtet möglichst identische Ausgangskonzentrationen einzusetzen, nämlich $7.8\mu\text{M}$ Bchl b.

Lösungsmittel	Halbwertszeit $t_{1/2}$ in sec
1,2-Dichlorbenzol	25
Petrolether	256
Methanol	50
Aceton	48
Chloroform	33
Benzol	30
i-Octan	145

4.4. Zusammenfassung

Durch Licht unter aeroben Verhältnissen läßt sich Bchl b leicht oxidieren. Es bilden sich dabei mindestens drei neue Produkte, die alle ein Absorptionsmaximum um 680nm zeigen, was auf die Umwandlung vom Bakteriochlorin ins Chlorin Gerüst hinweist. Die Bildung dieser Produkte ist vom Lösungsmittel unabhängig, wohingegen die Verteilung und v.a. die Kinetik ihrer Bildung davon beeinflußt werden. Eine Zuordnung der Polarität der einzelnen Lösungsmittel zur Geschwindigkeit der Bchl b Umwandlung ist nicht möglich. Von den getesteten Lösungsmitteln ist Bchl b am stabilsten in Petrolether und am instabilsten in Benzol.

5. Identifizierung der Photooxidationsprodukte

Die drei Photooxidationsprodukte ließen sich durch Ansäuern leicht phäophytinisieren. Eine Trennung gelang durch präparative DC (System 1 und 3; s.S. 12). Dabei treten drei verschiedene Zonen, geordnet nach steigender Mobilität, auf:

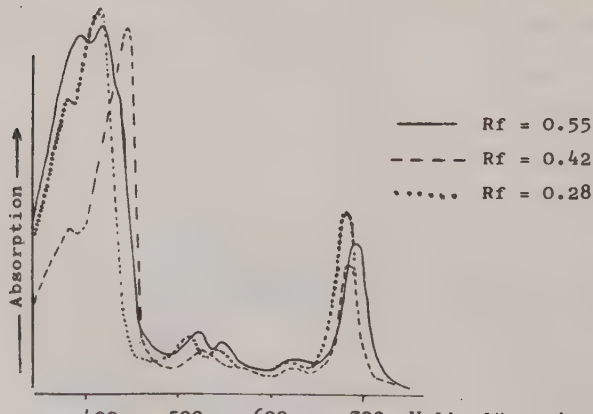
Zone 1: $R_f = 0.55$

Zone 2: $R_f = 0.42$

Zone 3: $R_f = 0.28$

5.1. Absorptionsspektroskopie

Im folgenden sind die Absorptionsspektren dieser drei getrennten Phäophytine angegeben:



Die folgenden Tabellen geben die Absorptionsmaxima und die relativen Extinktionen wieder:

Rf = 0.55

680	620	545	512	402	380	max. Absorption (nm)
1.0	0.13	0.16	0.19	2.31	2.22	A_{λ}/A_{680} (relative Intensität)

Rf = 0.42

674	612	sh.568	520	434	382	max. Absorption (nm)
1.0	0.14	-	0.24	2.77	1.09	A_{λ}/A_{674} (relative Intensität)

Rf = 0.28

678	618	542	508	412	380	max. Absorption (nm)
1.0	0.18	0.23	0.31	2.26	1.69	A_{λ}/A_{678} (relative Intensität)

Nach Umesterung in die Methylphäophorbide erhält man folgende, durch ihr Absorptionsspektrum charakterisierbare Produkte:

schnellste Fraktion:

682	625	545	514	415	381	max. Absorption (nm)
1.0	0.19	0.23	0.29	2.0	1.5	A_{λ}/A_{682} (relative Intensität)

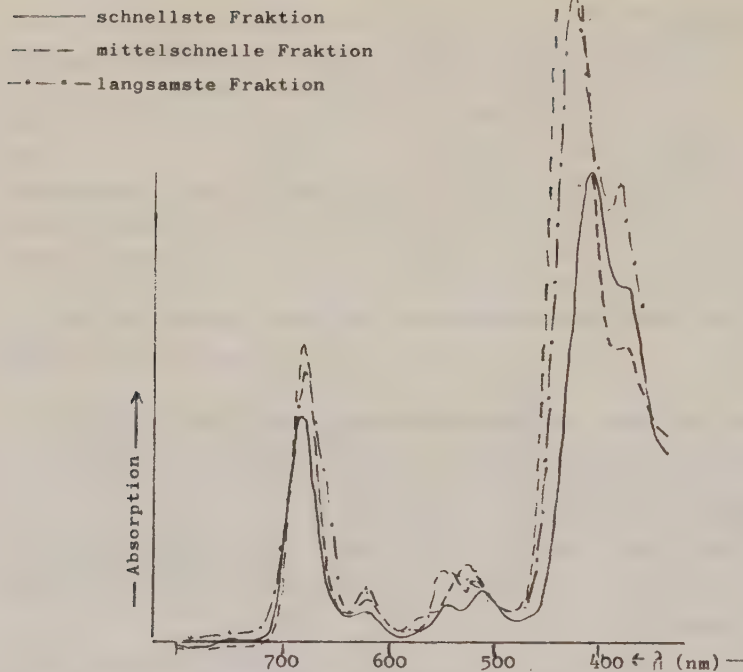
mittelschnelle Fraktion:

680	619	sh.565	527	438	380	max. Absorption (nm)
1.0	0.16	-	0.28	2.63	1.0	A_{λ}/A_{680} (relative Intensität)

langsamste Fraktion:

678	618	550	516	422	380	max. Absorption (nm)
1.0	0.22	0.30	0.39	3.09	2.0	A_{λ}/A_{678} (relative Intensität)

Spektroskopisch läßt sich der Phytylester mit dem Rf-Wert von 0.42, aufgrund seiner relativ langwelligen Soretabsorption (434nm) der mittelschnellen Fraktion der drei Methylphäophorbide zuordnen. Bei den anderen beiden Substanzen war dies aufgrund der geringen Mengen nicht eindeutig möglich. Auf der folgenden Seite sind nun die Absorptionsspektren der drei Methylphäophorbide dargestellt:

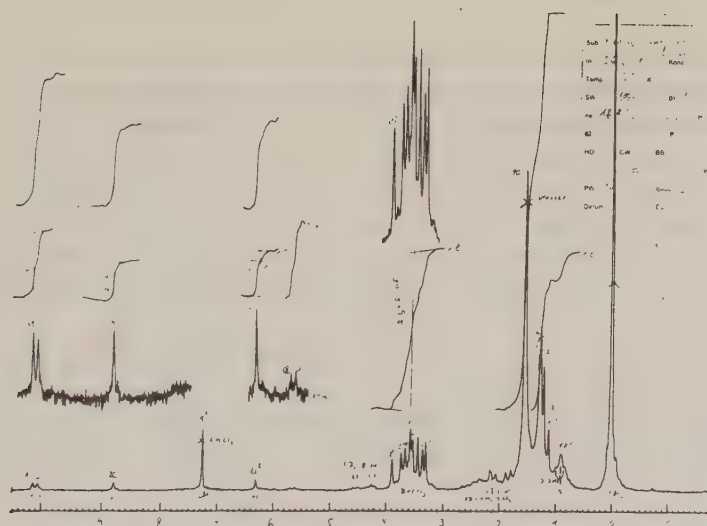


5.2. Kernresonanzspektroskopie der Methylphäophorbide

Die oben angegebenen Methylphäophorbide wurden nun durch H-NMR näher charakterisiert. Aufgrund von Mengenproblemen standen dafür nur die schnellste und die mittelschnelle Fraktion zur Verfügung. Die Proben wurden wie auf S. 15 beschrieben vorbereitet und konnten daraufhin untersucht werden.

5.2.1. H-NMR der schnellsten Fraktion

Im folgenden ist das H-NMR Spektrum dieser Fraktion angegeben:

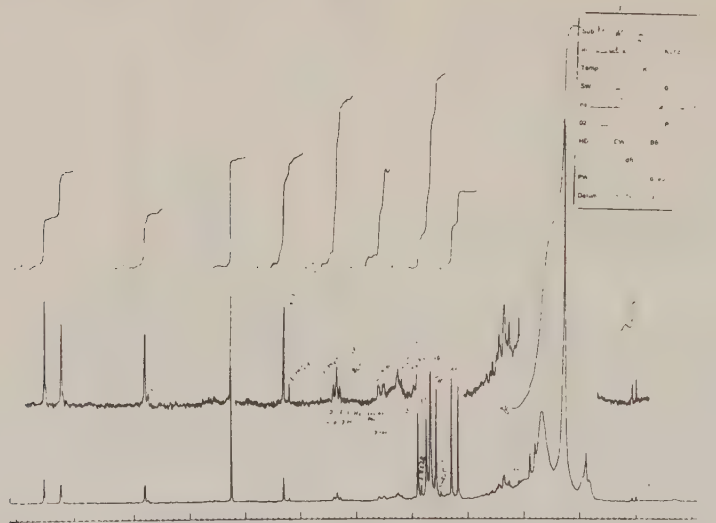


In der folgenden Tabelle sind die dazugehörigen Daten noch einmal zusammengefaßt:

ppm (δ)	Aufspaltung	n(H)	Zuordnung
10.14	s	1	10-H
10.07	s	1	5-H Methine
8.83	s	1	20-H
6.29	s	1	13 ² -H
5.65	q	1	8 ¹ -H
4.52	m	1	18-H
4.24	m	1	17-H
3.93; 3.75;			2; 3 ¹ ; 7-CH ₃
3.70; 3.62;	m	21	8 ¹ -OCH ₃ ; 12-CH ₃ ;
3.44; 3.32;			13 ⁴ ; 17 ⁴ -CH ₃
3.23			
1.81-2.38	m	4	17 ¹ -H; 17 ² -H
2.15	d	3	8 ² -CH ₃
1.85	d	3	18-CH ₃

5.2.2. H-NMR der mittelschnellen Fraktion

Auch hier ist zuerst das Spektrum angegeben und anschließend w.o. tabellarisch eine Zuordnung der einzelnen Peaks zu den entsprechenden Protonen.



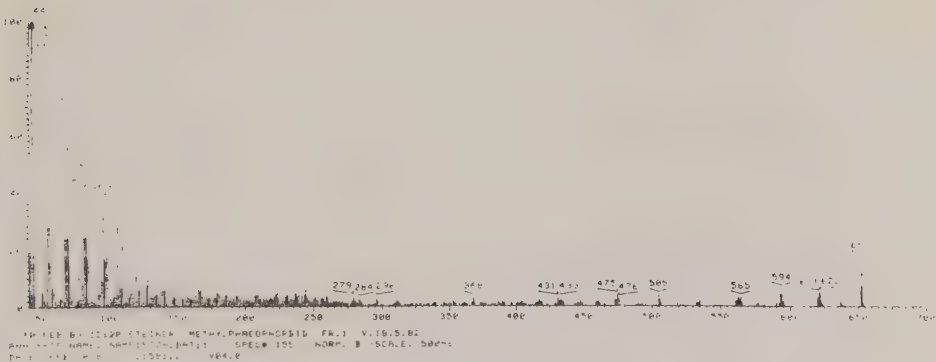
ppm (δ)	Aufspaltung	n(H)	Zuordnung
10.52	s	1	10-H
10.24	s	1	5-H Methine
8.81	s	1	20-H
6.31	s	1	13 ² -H
4.51-4.59	m	1	18-H
4.18-4.25	m	1	17-H
3.91; 3.83;			2; 3 ¹ ; 7;
3.75; 3.68;	m	21	8 ¹ ; 13 ⁴ ;
3.58; 3.30;			12; 17 ⁴ -CH ₃
3.18			
1.90-2.48	m	4	17 ¹ -H; 17 ² -H
1.62	d	3	18-CH ₃

5.3. Massenspektroskopie

Obwohl durch Kombination der Daten aus den Absorptionsspektren und der H-NMR Werte schon eine Vorstellung von den Strukturen vorlag, insbesondere wenn man sie mit Literaturdaten vergleicht (Mengler, 1966; Inhoffen et al, 1967), wurden noch Massenspektren der beiden Produkte angefertigt, um sichere Aussagen machen zu können, da die dabei auftretenden Fragmentierungskomponenten deutliche Rückschlüsse auf die Substituenten des Chloringerüsts zulassen (Smith, 1975; Budzikiewicz, 1978).

5.3.1. MS der schnellsten Fraktion

Die folgende Abbildung zeigt das MS der schnellsten Fraktion und die folgende Tabelle gibt das Fragmentierungsmuster wieder.

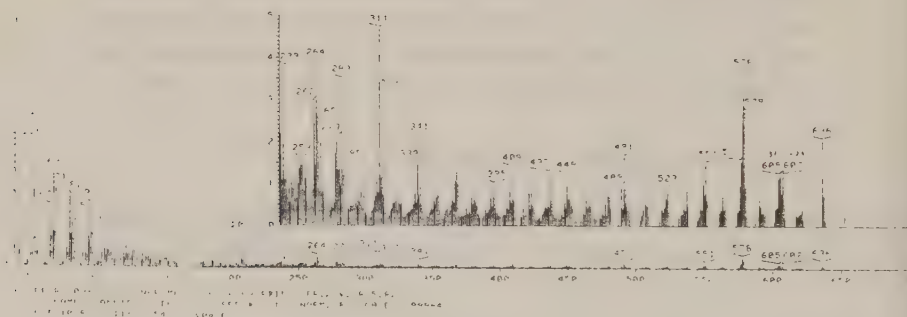


Fragmentierungsmuster:

- M = 652 (100%)
- M-15 (CH_3): 23% -637-
- M-31 (OCH_3): 41% -621-
- M-58 (COOCH_2): 45% -594-
- M-87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$): 23% -565-
- M-147 ($-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3-2\text{H}$): 27% -505-
- M-176 ($-\text{OCH}_3-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$): 27% -476-
- M-219 ($-\text{OCH}_3-\text{COCH}_3-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$): 23% -433-

5.3.2. MS der mittelschnellen Fraktion

Auch von dieser Fraktion sind die Daten im folgenden dargestellt:



Fragmentierungsmuster:

M = 636: 56%

M-15 (CH_3): 11% -621-

M-31 (OCH_3): 34% -605-

M-58 (COOCH_2): 100% -578-

M-87 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$): 27% -549-

M-145 ($-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$): 45% -491-

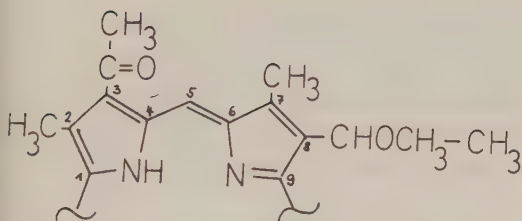
M-147 ($-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3-2\text{H}$): 23% -489-

M-187 ($-\text{COOCH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3-\text{COCH}_2$): 34% -449-

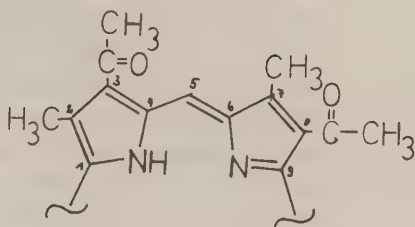
5.4. Diskussion der Ergebnisse und Zuordnung der Strukturen

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ließ sich der schnellsten Fraktion der Methylester die Struktur von 3-Acetyl-3-devinyl-8-(1-methoxy)ethyl-8-deethylmethylphäophorbid a und der mittleren Fraktion die von 3,8-Diacetyl-3-devinyl-8-deethylmethylphäophorbid a zuordnen.

Im folgenden sind die Formelbilder dargestellt:



3-Acetyl-3-devinyl-8-(1-methoxy)ethyl-8-deethylmethylphäophorbid a



3,8-Diacetyl-3-devinyl-8-deethylmethylphäophorbid a

Die spektroskopischen Daten sind mit solchen vergleichbar, die in der Literatur für die entsprechenden Pyromethylphäophorbide angegeben werden (Inhoffen et al, 1967), also Verbindungen, denen die 13^2 COOCH₃ Gruppe fehlt. Die Absorptionsspektren sind weitgehend identisch, wenn auch manches Intensitätsverhältnis nicht stimmt; insbesondere ist die Soretbande im Pyrodiacetylmethylphäophorbid a stärker ausgebildet. Dies mag auf das unterschiedliche Lösungsmittel zurückzuführen sein (Chloroform gegenüber Dioxan). Die H-NMR Spektren der Pyroverbindungen zeigen kein Methyl-Singulett im 3-4 ppm Bereich, das zur 13^2 COOCH₃ Gruppe gehört; außerdem sind die Methinsignale, wie sie für die Oxidationsprodukte von Bchl b erhalten wurden, zu niedrigerem Feld hin verschoben. Dies ist aber wohl auf die geringe Konzentration der obigen Proben zurückzuführen, weil eine Aggregation von Methylphäophorbiden Verschiebungen zu höherem Feld hervorruft (Scheer und Katz, 1975; Risch et al, 1978). Dieser Unterschied zwischen den obigen Daten und der Literatur (Inhoffen et al, 1967) ist in der Diacetylverbindung noch deutlicher ausgeprägt. Die meisten H-NMR Signale zeigen eine Verschiebung zu niedrigerem Feld (höhere ppm Werte), die vor allem beim 5- (10.24 gegenüber 9.76ppm) und beim 10-Methin

Signal (10.52 gegenüber 9.86ppm) stark ausgeprägt ist. Verschiebungen dieser Größenordnung wurden jedoch schon für die Methylphäophorbide von Bchl d beschrieben (Brockmann et al, 1976). Dort werden sie auf eine starke Tendenz zur Aggregation über den 3^1 -OH Substituent zurückgeführt. Das würde auf eine ähnliche Aggregation in der Diacetyl- gegenüber der Monoacetylkomponente hinweisen. In keinem der oben angegebenen Spektren konnten Satellitenpeaks bemerkt werden, die auf das 13^2 Epimere hinweisen (Katz et al, 1968).

Bei der aeroben Photooxidation von Bchl b entstanden also drei polarere Produkte, von denen zwei identifiziert werden konnten. Als polarste Fraktion bildete sich Hydroxiethylchl a, das bei der Umesterung zum Methylphäophorbid zum Methoxiethylphäophorbid a wurde. Bemerkenswert ist, daß etwa 13^2 -OH-Chl a bei der Umesterung zum Methylphäophorbid keine Methoxigruppe an C_{132} bildet (Schmidt, in Präp.). Als weniger polares Produkt entstand Diacetylchl a, dessen rot verschobene Soretbande charakteristisch ist (Mengler, 1966).

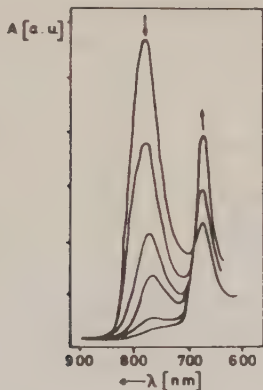
Die obigen Ergebnisse stimmen im übrigen gut mit denen überein, die kürzlich für Bchl g₉₉ aus *Heliobacterium chlorum* (Gest und Favinger, 1983) erhalten wurden. Hierbei handelt es sich um ein Bchl b, das an C_3 eine Vinyl- anstatt einer Acetylgruppe trägt (Brockmann und Lipinski, 1983). Auch dort werden als Oxidationsprodukte solche mit einer Acetyl- bzw. einer Hydroxiethylgruppe an C_8 diskutiert.

6. Mechanismus der Photooxidation

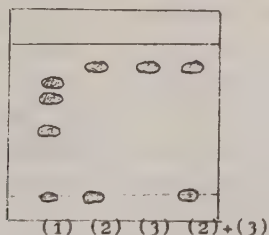
Wie gesehen entstehen bei der aeroben Oxidation von Bchl b durch Licht zwei Verbindungen, die einmal aufgrund ihres Chloringerüsts, zum anderen aber wegen der zusätzlich eingeführten Sauerstoffgruppe polarer sind. Letztere kann jedoch nicht aus dem Lösungsmittel kommen, da auch in solchen, die keinen Sauerstoff im Molekül enthalten, die gleichen Produkte entstehen (s.S. 41). Es ist daher anzunehmen, daß molekularer Sauerstoff eingebaut wird.

6.1. Anaerobe Photoreaktion

Um den Einfluß von Sauerstoff auszuschließen, wurde die Photo-
reaktion unter anaeroben Bedingungen nach Kap. 21 S. 19 durch-
geführt. Das folgende Absorptionsspektrum im Rotbereich zeigt
die bei Belichtung entstehende Änderung von Bchl b unter die-
sen Verhältnissen:



Rein spektroskopisch ließ sich noch kein Unterschied zu den auf
S. 42 gezeigten aeroben Photooxidationen feststellen, denn in
beiden Fällen verschwindet die 794nm Bande zugunsten einer
neuen um 680nm (angedeutet durch die Pfeile). Deshalb wurde
das Produkt der anaeroben Photooxidation mit denen der aeroben
auf einer DC verglichen (System 4; s.S. 12)

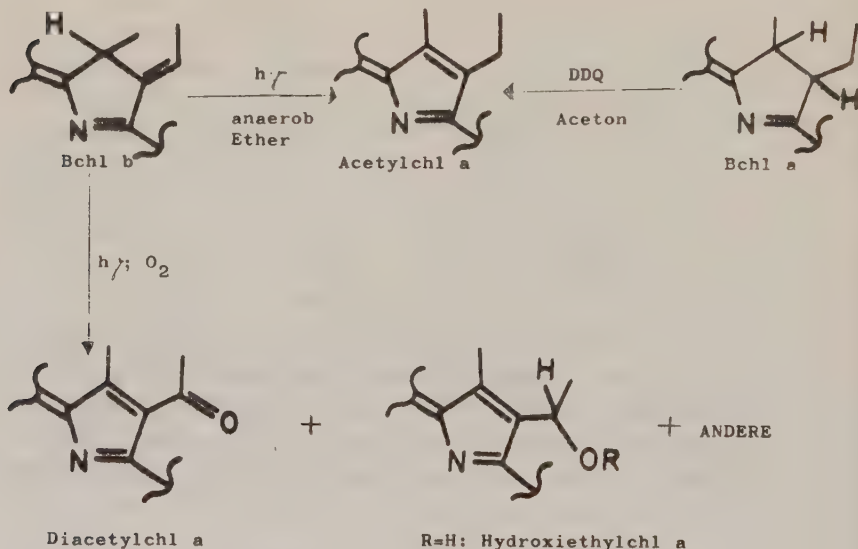


- (1) Photoprodukte von Bchl b unter aeroben Bedingungen
(2) —————#————— anaeroben Bedingungen
(3) 3-Devinyl-3-acetylchl a

Wie man anhand der DC erkennen kann, entsteht bei der anaeroben Photoreaktion von Bchl b das reine Isomerisierungsprodukt nämlich 3-Devinyl-3-acetylchl a. Das gleiche Ergebnis erhält man auch auf einer RP-HPTLC Platte (System: 6; s.S. 12).

6.2. Zusammenfassung und Extinktionskoeffizienten von Bchl b

Die Ergebnisse, wie sie bisher erhalten wurden lassen sich in das folgende Formelschema bringen:



3-Devinyl-3-acetylchl a läßt sich also einmal aus Bchl a mit DDQ unter aeroben Bedingungen, zum anderen aus Bchl b unter anaeroben Verhältnissen darstellen.

Da der Extinktionskoeffizient für 3-Devinyl-3-acetylchl a in Ether bekannt ist (Smith und Calvin, 1966): 65200, läßt sich aus den Daten der Abbildung (s.S. 53) der für Bchl b ausrechnen. Nimmt man einen "Grund-Extinktionskoeffizient" von 10000 für die Bchl b Absorption bei 680nm an, dann erhält man $\xi = 106000$

für $\lambda = 794\text{nm}$. Somit lassen sich auch die anderen Extinktionskoeffizienten angeben:

$\lambda_{\text{max.}}$ von Bchl b (Ether):	794	676	578	408	368 (nm)
Extinktionskoeffizient ϵ' :	106000	13700	26500	77400	85700

Im Vergleich zu Bchl a liegen diese Werte viel höher, stimmen in ihrer Größenordnung aber mit Literaturdaten überein (Oelze, 1984; in Präp.). So werden $\lambda_{790} = 122000$ in Aceton/MeOH angegeben (Garcia et al, 1968); dieser Wert stammt jedoch aus einem in vivo Wert $\epsilon'_{1015} = 144000$ (Clayton, 1966; Clayton und Clayton, 1977).

6.3. Quenchversuche

Wie gesehen bildeten sich die oben angegebenen Photooxidationsprodukte nur bei Anwesenheit von Sauerstoff. Da viele Tetrapyrrole Singulett-Sauerstoff Sensibilisatoren und gleichzeitig empfindlich gegenüber Singulett-Sauerstoff sind (Gollnick, 1968), lag die Vermutung nahe, daß die Reaktion nach diesem Mechanismus verläuft. Darauf deuteten auch folgende Versuche hin:

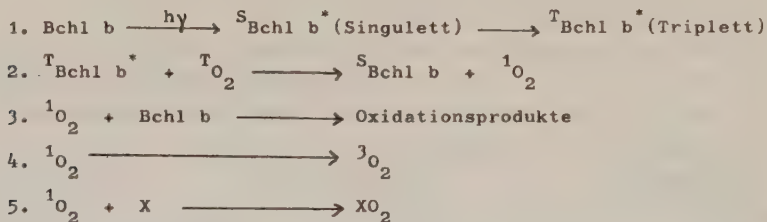
Gibt man einmal eine äquimolare β -Carotinlösung, sowie zum anderen einen vierfachen Überschuß derselben zu einer acetoni-schen Bchl b Lösung und belichtet diese wie oben beschrieben, dann verlangsamte sich die Bildung von Bchl b_{ox.} um den Faktor 6. Gibt man andererseits einen 50-fachen Überschuß Methylenblau zu, so wurde die Reaktion um den Faktor 3.5 schneller. Deuteriertes Aceton änderte andererseits nichts an der Reaktionsgeschwindigkeit.

Alle diese Versuche deuteten darauf hin, daß $^1\text{O}_2$ das entscheidende Oxidans ist.

6.4. Theorie der Singulett-Sauerstoff Bildung

Bchl b wird durch Licht in einen angeregten Singulett Zustand gebracht und wirkt so als Sensibilisator. Anschließend geht ein Teil in den Triplett Zustand über, welcher seine Energie

auf "normalen" Triplett Sauerstoff übertragen kann, sodaß dieser in seinen angeregten Singulett Zustand übergeht. Dieser kann dann u.a. seinen eigenen Sensibilisator, Bchl b, oxidieren. Damit ist Bchl b auch Katalysator für die $^1\text{O}_2$ Bildung. Dies ist in den folgenden Formeln noch einmal zusammengefaßt:



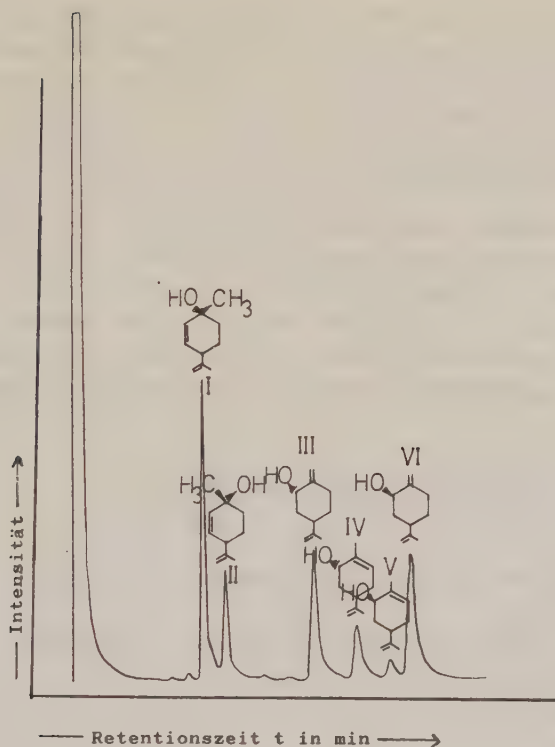
X sein obigem Schema irgendein Akzeptor für Singulett Sauerstoff. Wie man erkennen kann, handelt es sich bei den Reaktionen 3, 4 und 5 um Konkurrenzreaktionen. Nur wenn $^1\text{O}_2$ mit seinem eigenen Sensibilisator reagiert (Reaktion 3), entstehen die beschriebenen Oxidationsprodukte.

6.5. Nachweis durch Zusatz von Limonen

Ein sicherer Nachweis von $^1\text{O}_2$ ist durch die quantitative Reaktion mit Limonen möglich (Schenck et al, 1964). Wenn an einer Reaktion Singulett Sauerstoff beteiligt ist, konkurriert Limonen effektiv um diesen (entspricht Gleichung 5; s.o.) und reagiert zu Hydroperoxiden; mit Sulfit lassen sich diese zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren, welche ihrerseits ein charakteristisches Muster im GC ergeben (s.S. 20).

6.5.1. Gaschromatographie der entstandenen Alkohole

Auf der folgenden Seite ist das GC abgebildet, wie es von den entstandenen Alkoholen erhalten wurde. Über den jeweiligen Peaks sind dabei die entsprechenden chemischen Strukturen dieser angegeben. Das gleiche Spektrum wurde auch erhalten, wenn man sowohl Bchl b, als auch die Photooxidationsprodukte anregt, also keinen 720nm Filter verwendet (s.S. 20).



6.5.2. Vergleich mit Literaturdaten

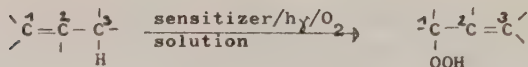
Die folgende Tabelle gibt die Alkoholverteilung wieder und vergleicht die gefundenen Werte mit Literaturdaten (Schenck et al, 1964; Gollnick, 1968):

Alkohol Nr.	Literatur	gefunden	Autoxidation
I	34%	35%	11%
II	10%	14%	12%
III	20%	19%	0%
IV	10%	8%	22%
V	5%	3%	19%
VI	21%	21%	0% u.a.

Vor allem die Peaks IV und V, die bei einer Autoxidation als Hauptprodukte auftreten, weisen auf einen Singulett-Sauerstoff Mechanismus hin.

6.6. Theorie der ene-reaction

Nachdem nun feststand, daß die Reaktion über 1O_2 verläuft, galt es einen Reaktionsmechanismus aufzustellen, der mit den gefundenen Strukturen der Oxidationsprodukte übereinstimmt. Eine typische Reaktion für 1O_2 ist neben der Bildung von Ozoniden v.a. die sog. ene-reaction (Kearns, 1971; Gollnick, 1975). Diese verläuft schematisch folgendermaßen ab (aus Gollnick, 1975):



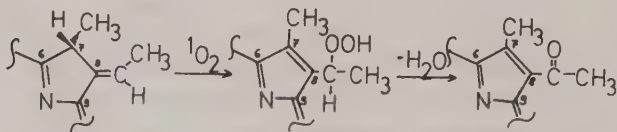
Für eine solche Reaktion gelten die folgenden drei, grundlegenden Tatsachen:

1. Angriff des Sauerstoffs an ein C-atom einer Doppelbindung (z.B. an C_1).
2. Verschiebung der Doppelbindung in die Allylposition (z.B. von C_2 nach C_3).
3. Wanderung des Allyl-H-atoms zur Peroxogruppe.

Dabei treten aber in keinem Fall freie Radikale auf; in dieser Beziehung paßt die ene-reaction zu den beobachteten Ergebnissen.

6.7. Möglicher Angriff von 1O_2 auf Bchl b

Aus den oben beschriebenen Tatsachen läßt sich nun der Angriff von 1O_2 auf Bchl b wie folgt formulieren:

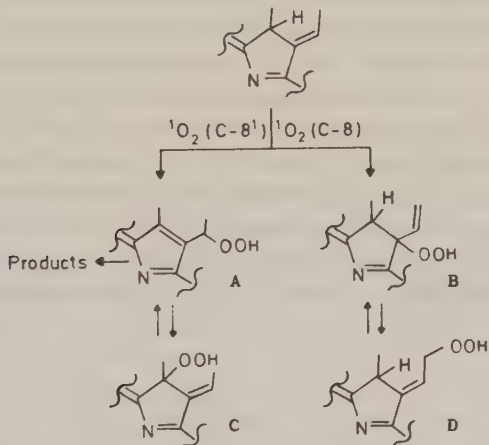


Bchl b

Hydroperoxid

Diacetylchl a

Auch hier greift der Sauerstoff an das C-atom einer Doppelbindung, nämlich an C₈ an. Die Doppelbindung verschiebt sich in Allylposition von C₈ nach C₇ und das Allyl-H an C₇ wandert zur Peroxogruppe an C₈. Es gibt theoretisch zwei mögliche Peroxide, einmal kann ¹O₂ nämlich an C₈ und einmal an C₈ angreifen. Die Verhältnisse sind in folgendem Schema dargestellt:



Theoretisch können sich zwei primäre Peroxide bilden (A und B) und zwei weitere (C und D), die aus ersteren durch Isomerisierung entstehen. Da jedoch nur A eine Doppelbindung zwischen C₇ und C₈ enthält, ist dies wohl das entscheidende Hydroperoxid, aus dem sich dann leicht (s.o.) das Diacetylchl a ableiten läßt. Auch der Angriff von ¹O₂ auf Limonen führt nicht zu allen theoretischen Isomeren. Das C₈-Hydroxiethylchl a, welches als zweites Oxidationsprodukt nachgewiesen werden konnte, könnte durch Reduktion (evtl. auch Disproportionierung) aus dem Diacetylchl a entstehen. Ob dabei auch das, bis jetzt noch nicht identifizierte, dritte Produkt entsteht, darüber soll hier nicht entschieden werden. Auch wäre die Bildung eines Ozonoids denkbar, aus dem sich die bislang nicht identifizierte Substanz ableitet.

6.8. Zusammenfassung

Während Bchl b unter anaeroben Bedingungen zu Acetylchl a photoisomerisiert, bildet sich bei Anwesenheit von Sauerstoff bei Belichtung Diacetylchl a und Hydroxiethylchl a, sowie zusätzlich eine bislang nicht identifizierte Substanz. Die Reaktion läuft dabei über $^1\text{O}_2$ nach dem Schema einer ene-reaction. Durch Zugabe von Carotinoiden läßt sich diese Reaktion quenchen. Dabei übernehmen die Carotinoide die Energie des $^1\text{O}_2$ und gehen in den Triplettzustand über; dieser liegt energetisch nicht allzu hoch, sodaß der Grundzustand leicht wieder erreicht werden kann (Clayton, 1980), die Energie wird normalerweise als Wärme abgegeben. Dieses Schema erklärt die unterschiedlichen Produkte von Bchl b_{ox.} früherer Arbeiten. Beim Arbeiten mit Bchl b empfiehlt es sich also 1. Licht zu vermeiden, 2. als Lösungsmittel Petrolether zu verwenden und 3., solange sie nicht stören, Carotinoide zuzusetzen.

ÜBERLEITUNG

Die bislang dargestellten Ergebnisse gaben alle rein chemische Aspekte wieder. So konnten die Strukturen modifizierter Chlorophylle aufgeklärt und Pigmentanalysen erfolgreich durchgeführt werden. Die dargestellten Absorptionsspektren waren in organischen Lösungsmitteln aufgenommen. Es war jetzt natürlich interessant, zu in vivo Untersuchungen überzugehen, um auch über a. das ganze Bakterium *E. halochloris*, bzw. b. über seine photosynthetisch aktive Membran und die darin enthaltenen Proteine nähere Aussagen machen zu können.

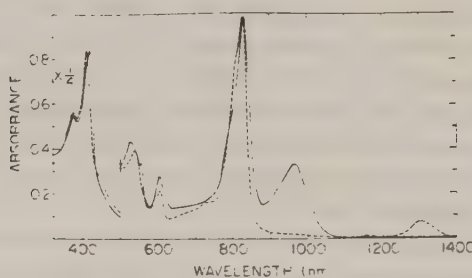
Neben den Reaktionszentren sollte jetzt auch der Lichtsammler Apparat von *E. halochloris* im Mittelpunkt stehen, sowie die ganze Photosynthesemembran. Ausgangspunkt waren dabei Versuche zur Isolierung von RC. Dabei wurde sowohl biochemisch, als auch elektronenmikroskopisch die Dissoziation der Chromatophore untersucht. Die solubilisierten Pigment-Protein-Komplexe wurden anschließend getrennt und der LHCP dieses Bchl b haltigen Bakteriums näher charakterisiert.

Auch bei diesen Ergebnissen waren jedoch, wie noch zu sehen sein wird, häufig Rückbezüge auf das bisher Dargestellte, nicht nur zur Erklärung wertvoll, sondern ließen auch ein gezieltes Vorgehen in der einen oder anderen Richtung zu. Nur in der Gesamtheit rein chemischer Daten mit den in vivo Ergebnissen rundete sich so das Bild dieses Bchl b haltigen Organismus ab. Da auch in dieser Beziehung über *Rp. viridis* viel bekannt war, wurden die neuen Ergebnisse an *E. halochloris* immer damit verglichen, um a. Gemeinsamkeiten deutlich zu machen, um aber auch b. anhand von signifikanten Unterschieden auf die Besonderheit dieses Bakteriums hinzuweisen.

Bchl B - PROTEINE AUS E. HALOCHLORIS

CHARAKTERISIERUNG DES REAKTIONSZENTRUMS VON E. HALOCHLORIS

RC sind integrale Membranproteine und u.a. dadurch gekennzeichnet, daß sie eine reversible Photochemie (z.B. Ausbleichen bei einer bestimmten, festen Wellenlänge) zeigen, was sich spektroskopisch gut untersuchen läßt. Im folgenden ist das Absorptionsspektrum der RC des Bchl b haltigen Organismus *Rp. viridis* bei Stark- und Schwachlicht dargestellt (Pucheu et al, 1976; Thornber et al, 1969; 1971; Trosper et al, 1976).



--- Starklichtspektrum (aus: Thornber et al, 1969)
 — Schwachlichtspektrum

Man erkennt, daß im Starklicht die langwellige Absorption bei 960nm ausbleicht, daß sich die 830nm Bande leicht verschiebt und eine neue Bande im IR auftritt. Eine Erklärung liefert das bereits schematisch dargestellte Bild der Elektronentransportkette (s.S. 3). Durch Belichtung entsteht aus einem Bchl b Dimer das Kationradikal $(Bchl\ b)_2^{+\bullet}$. Der Schritt seiner Rückreduktion ist der langsamste in dieser Kette, sodaß unter obigen Bedingungen dieses Radikal, zusammen mit dem Semichinonanionradikal akkumuliert wird. Dieses Bakteriochlorophyllkationradikal hat jedoch keine ausgeprägte Absorption mehr bei 960nm, sondern stattdessen bei 1350 nm, sodaß dadurch das Spektrum erklärt werden kann. Obwohl nun

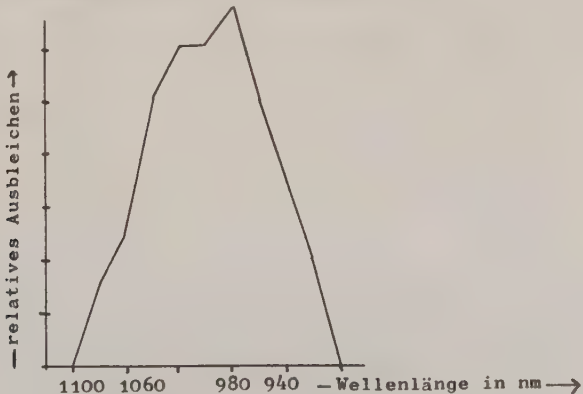
nur etwa 1/50 der Bchl Moleküle in Chromatophoren dem RC zuzuordnen sind (der Rest ist Antenne), kann man diese reversiblen Absorptionsänderungen im Licht auch an ihnen messen, wenn man sich schrittweise, konstant auf verschiedene Wellenlängen setzt und dort Hell-Dunkel-Differenzmessungen durchführt. Vom Prinzip erhält man folgendes Bild:



Die Absorptionsänderung A ist dort am größten, wo auch das RC ausbleicht (bei *Rp. viridis* also bei 960nm). Deshalb läßt sich auf diese Weise das Absorptions-Differenzspektrum von RCs in ganzen Chromatophoren bestimmen.

1. Hell-Dunkel-Differenzspektrum an Chromatophoren von *E. halochloris*

Das folgende Bild zeigt das Ausbleichen in Chromatophoren von *E. halochloris* in Abhängigkeit der Wellenlänge:



Man erkennt, daß das RC von *E. halochloris* um 980nm ein Absorptionsmaximum besitzen muß, also etwa in dem Wellenlängenbereich, in dem auch dasjenige von *Rp. viridis* liegt.

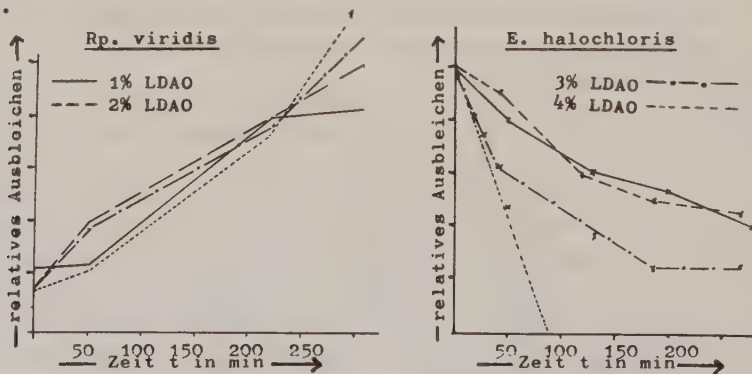
2. Ausbleichmessungen bei verschiedenen Detergenskonzentrationen

RC sind, wie bereits gesagt wurde, hydrophobe Membranproteine und lassen sich als solche nur durch Tenside aus der Membran herauslösen. In der Vergangenheit waren die meist verwendeten Detergentien dabei LDAO und Triton X-100 (als Bsp.: Gingras, 1978).

Als Kriterium für die Dissoziation der Membran und die Anreicherung von RCs dienten wieder Hell-Dunkel-Ausbleichmessungen, wie sie bereits oben beschrieben wurden. Diese Methode setzt allerdings, insbesondere bei partiell aufgereinigten Proben, einen intakten Energietransfer von der Antenne auf das RC voraus.

2.1. Versuche mit LDAO

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen das prozentuale Ausbleichen von Chromatophoren aus *Rp. viridis* und *E. halochloris* in Abhängigkeit der Inkubationszeit und der LDAO Konzentration.



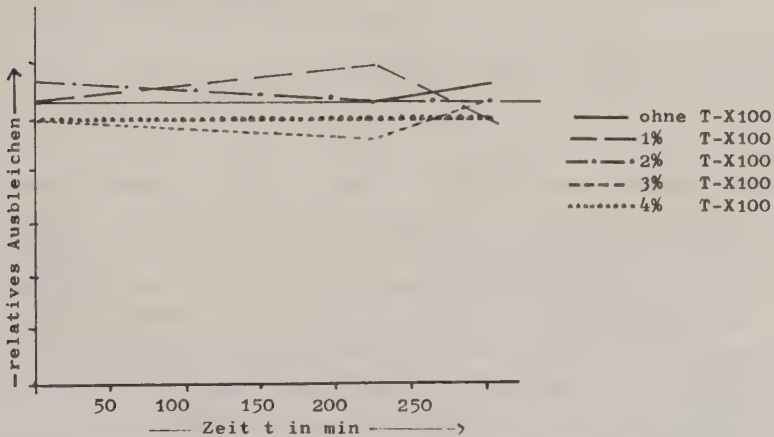
Während die *Rp. viridis* RCs sehr stabil gegenüber LDAO sind, was nicht verwundert, da zu ihrer Isolierung 5% des Tensids verwendet werden (Pucheu et al, 1976; Michel, 1982) - ja je länger man das Detergens einwirken läßt, desto größer wird der Effekt (das Ausbleichen mit 4% LDAO ist nach 300min sechs mal so groß wie zu Beginn) - zeigen die entsprechenden Versuche mit *E. halochloris* ein deutliches Abnehmen des Effekts. Hier

ist das Ausbleichen bei Zugabe von 4% LDAO bereits nach 50min nur noch halb so groß. In Kombination mit dem Absorptionsspektrum (Auftreten eines Peaks um 680nm) wies dies darauf hin, daß Bchl b in *E. halochloris* wegoxidiert wurde, einem oxidativen Zutritt also viel mehr ausgesetzt sein muß.

Die mit *Rp. viridis* erzielten Ergebnisse lassen sich auf zwei Arten erklären: Durch LDAO wird entweder der Elektronentransport verlangsamt, oder das Ankoppeln der Antenne ans RC verbessert.

2.2. Versuche mit Triton X-100

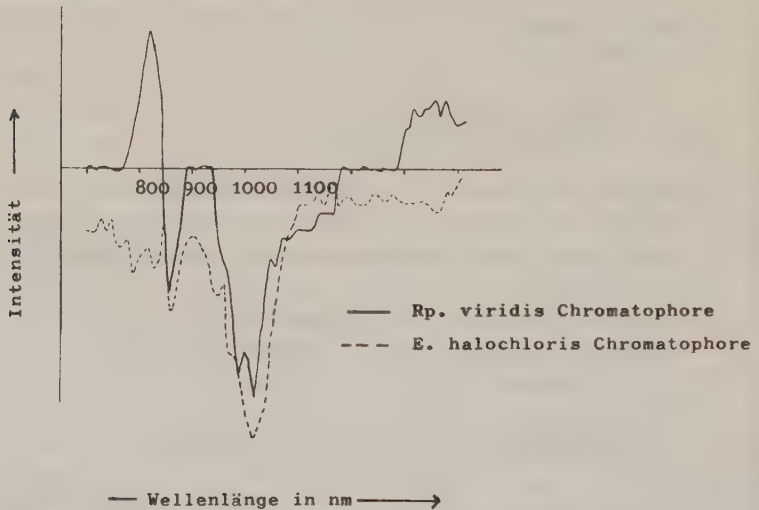
LDAO ist, vermutlich durch seine oxidierend wirkende Aminoxidgruppe, nicht geeignet das RC von *E. halochloris* zu solubilisieren. Ganz andere Ergebnisse wurden jedoch erhalten, wenn man stattdessen Triton X-100 verwendet. Die Verhältnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt:



Das Bleichen ganzer Chromatophore wird durch Zugabe von Triton X-100 nicht entscheidend beeinflusst. Sie sind also in diesem Detergens ungleich stabiler als in LDAO; auch spektroskopisch ließ sich keine Veränderung feststellen, der langwelligste Peak erscheint nach wie vor bei 1020nm. Absolut betrachtet, muß an dieser Stelle betont werden, daß der Effekt, bei gleicher Ausgangskonzentration der Chromatophore, bei *E. halochloris* sehr viel geringer ausgeprägt ist als bei *Rp. viridis* (nur etwa 25%).

3. Hell-Dunkel-Differenzspektren

Die folgende Abbildung zeigt das Hell-Dunkel-Differenzspektrum von *E. halochloris* und *Rp. viridis*, wie man es nm für nm (per Hand) am DMR erhält:

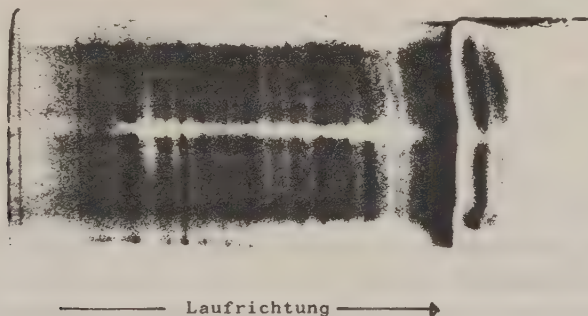


Das Spektrum von *Rp. viridis* stimmt, bis auf die negative Bande bei 1020nm, gut mit der Literatur überein (Klimov et al, 1976). Deutlich erkennt man die positive Absorptionsbande bei 1350nm und das S-förmige Signal zwischen 800 und 900nm, das sich durch die bereits erwähnte Absorptionsverschiebung erklären läßt. Der ungewöhnliche negative Peak bei 1020nm könnte durch eine Fluoreszenz der Chromatophore zustande kommen (Photomultiplier Charakteristik). Unter diesen Bedingungen findet sich bei *E. halochloris* keine Entsprechung. Versuche von B. Kalomenos (in Präp.) sollen dies jedoch weiter klären.

4. Der Proteinanteil des Reaktionszentrums

Es wurde schon mehrfach darauf hingewiesen, daß RCs integrale Membranproteine sind. Als solche sind sie in einem SDS Gel gut charakterisierbar, zumal es beim Auftragen von Chromato-

phoren Bchl b haltiger Organismen immer wieder auffällt (Jay et al, 1983), welche geringe Anzahl von Proteinbanden zu finden sind. Während etwa das SDS Gel von *Rp. sphäroides* Chromatophoren (Methode s.S. 18) über den ganzen Molekulargewichtsbereich eine Vielzahl anfärbbarer Banden zeigt (s. Abb.), ist das von *Rp. viridis* Chromatophoren viel weniger strukturiert (Jay et al, 1983) und es finden sich i.A. nur sieben Banden.



SDS-Gel von *Rp. sphäroides* Chromatophoren mit einer Vielzahl verschiedener Banden

Die vier schwereren werden dem RC zugeordnet, die drei leichteren dem Lichtsammelkomplex. *E. halochloris* zeigt ein Proteinstreifenmuster, das dem von *Rp. viridis* vergleichbar ist (Abb. siehe später). Generell läßt sich sagen, daß im RC-Bereich die Banden etwas mobiler sind als diejenigen von *Rp. viridis* (entsprechend 28, 26 und 17 kDa gegenüber 33, 27 und 24 kDa). Zusätzlich tritt, wie bei allen Bchl b haltigen Bakterien, eine vierte, schwerere Bande auf, die, analog zu *Rp. viridis*, ein Cytochrom sein dürfte. Auch diese ist etwas mobiler (entsprechend 34 gegenüber 38 kDa). Ein ähnlich geringer MWG-Unterschied wurde auch für die H, M und L Untereinheit der RCs aus *Rp. sphäroides* R-26 (Okamura et al, 1974) im Vergleich zu Chroma-

tium vinosum gefunden (Ackerson et al, 1975). Die folgende Tabelle zeigt noch einmal einen Vergleich der aus den SDS Gelen verschiedener Bchl b haltiger Organismen (RCs oder ganze Chromatophore) gewonnenen MWGs.

Bchl b haltiges Bakterium

Rp. viridis (Jay et al, 83)	E. halochloris	T. pfennigii (Seftor und Thornber, 84)	
38	34	40	Cytochrom
33	28	34	H
27	26	27	M
24	17	26	L

(alle Angaben in kDa)

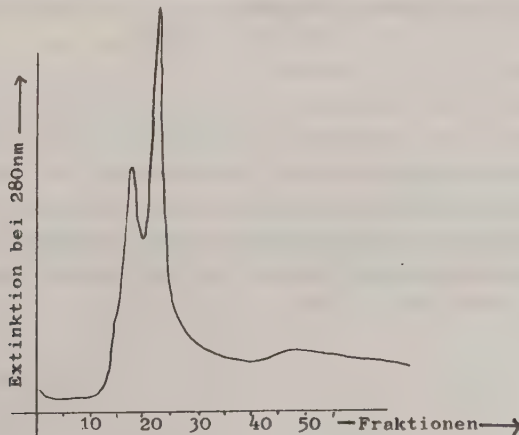
Bereits an dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Molekulargewichtsbestimmung allein über das SDS Gel sehr problematisch ist. So sind die Daten nur als Rf-Werte im Vergleich zu anderen Bakterien geeignet und haben mit dem tatsächlichen MWG wenig zu tun. So zeigte die M Untereinheit des RCs von Rp. sphäroides R-26 dem Gel nach ein MWG von 24kDa, wohingegen das tatsächliche MWG nach der AS-sequenz 34265 betrug (Williams et al, 1983). Allgemein läßt sich sagen, daß im RC Bereich die im Gel gefundenen Werte immer zu niedrig ausfallen, wie dies für die meisten Membranproteine zutrifft (siehe jedoch die MWGs der Antennenpeptide im folgenden).

ISOLIERUNGSVERSUCHE DER REAKTIONSZENTREN VON E. HALOCHLORIS

1. Chromatographie

1.1. Ausschluß (=Gel) Chromatographie

Die ersten Versuche zur Gewinnung photosynthetischer RCs wurden an *Rp. sphäroides* R-26 (Reed und Clayton, 1968) und an *Rsp. rubrum* G-9 (Gingras und Jolchin, 1969) durchgeführt. Bei Bchl b haltigen RCs sind gute Präparationen seit 1976 bekannt (Pucheu et al, 1976; Thornber et al, 1977; Thornber und Thornber, 1980). Michel et al stellten die RCs für ihre Kristalle durch Gelchromatographie dissoziierter Chromatophore dar. Die gleiche Isolierungsmethode wurde auch für *E. halochloris* getestet. Als Ausgangssubstanz dienten Chromatophore mit einer Extinktion von 50 bei 1020nm (1cm Küvetten). Diese wurden in einem Dichtegradienten (25-50% Saccharose in 10mM Tris, pH = 7.0 und 0.1% NaN_3) 14h lang bei 50000g zentrifugiert. Dabei trat eine deutliche Bande bei etwa 35% Zucker auf. Diese Fraktion wurde durch 20mM Tris, 0.1% NaN_3 , 0.1% EDTA, pH = 7.0 zuckerfrei gewaschen (dreimaliges, 30minütiges zentrifugieren bei 42000g und resuspendieren). Die gesammelte Fraktion wurde noch einmal 30min bei 30000g abzentrifugiert, im Potter auf Eis wieder homogenisiert und 10min mit 5% LDAO gerührt. Anschließend wurde die Probe auf eine Gelchromatographie Säule aufgetragen, die vorher mit 20mM Phosphatpuffer, 0.1% NaN_3 , 0.1% LDAO equilibriert worden war. In der folgenden Abbildung ist ein typisches Elutionsdiagramm (aufgenommen bei 280nm) dargestellt:



Es zeigen sich, ganz ähnlich wie bei den Proben von *Rp. viridis* 2 deutliche Peaks. Eine spektroskopische Auswertung im sichtbaren Bereich ergab jedoch in beiden Banden nur noch ein Maximum von 680nm (also Bchl b_{ox}) und auch im SDS Gel ließ sich keine RC Anreicherung feststellen.

1.2. Cytochrom c Affinitätschromatographie

(nach Brudvig et al, 1982; verändert)

Eine elegante Methode der Isolierung von RCs aus *Rp. sphäroides* bietet die Affinitätschromatographie (Godinot und Gautheron, 1979; Cuatrecasas und Anfinsen, 1979). Da Cytochrome vom c Typ nicht zum RC von obigem Bakterium gehören, sollte das RC dadurch gekoppelt werden und so spezifisch vom übrigen Membranprotein abgetrennt werden können (Rosen et al, 1979; 1980;)

5g CNBr-aktivierte Sepharose wurden in 500ml bidest. Wasser 2h lang gequollen und anschließend in einem Büchnertrichter mit 1l H_2O bidest., 1l 1M HCl und noch einmal mit 1l H_2O bidest. gewaschen. Dann wurde die Sepharose in 10ml 0.1M Bicarbonatpuffer (pH = 8.0) gelöst und anschließend wurden 100mg Cytochrom c zusammen mit 10ml 0.1M Bicarbonatpuffer zugegeben und 90min bei RT inkubiert, wobei gelegentlich mit einem Glasstab umgerührt wurde. Das Gel wurde wieder in einem Büchner Trichter mit 100ml 0.1M Bicarbonatpuffer gewaschen, in 50ml Ethanolamin (1M, pH = 8.0) aufgenommen und 1h bei RT stehen gelassen. Daraufhin wurde es in einem Büchner-Trichter mit folgenden drei Lösungen gewaschen:

1. 200ml 0.1M NaOAc Puffer (pH = 5.0)
2. 200ml 1.0M KCl + 1% LDAO
3. 200ml 0.1M Bicarbonatpuffer (pH = 8.0)

Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt und daran anschließend das braunrote Gel mit 15mM Tris, 50mM KCl, 1% LDAO, 1mM EDTA (pH = 8.0) equilibriert.

Chromatophore wurden mit 1% LDAO 10min inkubiert, bei 50000g 30min abzentrifugiert und der Überstand des farblosen Pellets auf die Säule aufgetragen.

Während mit 300mM KCl auf diese Weise sehr saubere RCs von Rp. sphäroides von der Säule kamen, wobei es jedoch unbedingt nötig war bei 4°C im Kühlraum zu arbeiten, versagte die Methode bei Bchl b haltigen Organismen, also sowohl bei Rp. viridis, als auch bei E. halochloris.

Rp. viridis enthält in seinem RC eine spezielle, höhermolekulare Cytochrombande (s. später) und eine entsprechende Bande wurde bei E. halochloris ebenfalls als solche zugeordnet (s. S. 68). Diese mag dafür verantwortlich sein, daß die entsprechende Bindungsstelle schon besetzt ist und daß sich Bchl b haltige RCs deshalb nicht an die Säule binden lassen.

1.3. Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Zellulose

1.3.1. Variation der Pucheu - Methode

RCs von Rp. viridis lassen sich einfach durch einmalige Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Zellulose isolieren (Pucheu et al, 1976). Da nach den Vorversuchen (s.o.) die RCs von E. halochloris viel labiler gegenüber LDAO sind, wurde versucht durch Variation der Tensidkonzentration eine RC angereicherte Fraktion zu erhalten. Deshalb wurden die Chromatophore mit 0.5 - 4% Tensid inkubiert und über Nacht gegen 0.1% dialysiert um sie dann auf einer DEAE Säule zu fraktionieren.

Dabei zeigte sich, daß ab 1% LDAO nur noch 680nm Produkt erscheint und daß die Eluate bei 0.5% 1020 und 680nm Produkt in etwa gleichem Verhältnis aufweisen. Im SDS Gel erschienen alle Banden, die man auch in ganzen Chromatophoren erhält, also neben dem RC auch den LHCP Bereich.

1.3.2. Stabilisierung durch pH-Änderung

Die "Pucheu-Methode" wurde, um einen evtl. störenden Einfluß des pH-Wertes auszuschließen, einmal bei pH = 8.0 und einmal bei pH = 9.0 durchgeführt, wobei letzterer auch dem Medium von E. halochloris entspricht. Auch diese "basischen" Bedin-

gungen lieferten aber keine zufriedenstellenden Ergebnisse, sondern zeigten spektroskopisch wieder die Oxidationsprodukte.

1.3.3. Stabilisierung durch Zugabe von Natriumascorbat

Die Stabilität von freiem Bchl b bei HPLC Untersuchungen konnte durch Zusatz von Natriumascorbat als Antioxidans bedeutend verbessert werden. (Steiner et al, 1982). Aus diesem Grund wurden auch bei der Bereitung und Durchführung einer Ionenaustauschersäule die verwendeten Puffer und Lösungsmittel mit 1% Na-ascorbat versetzt. Die Versuche wurden einmal mit 2 und einmal mit 4% LDAO durchgeführt.

Es ließen sich drei Fraktionen von der Säule isolieren, die jedoch im Falle der höheren Tensidkonzentration alle nur noch Bchl b_{ox}. enthielten und nur die erste Fraktion der 2% LDAO Probe, die kein Protein enthielt, zeigte ein 790/680nm Verhältnis von 1/1. Auch hier tauchten bei den proteinhaltigen Fraktionen alle, für die ganze Membran typischen Banden, im SDS Gel auf, eine RC Anreicherung oder Stabilisierung gelang also nicht.

1.3.4. Variation des zur Dissoziation eingesetzten Tensids

RCs sind als Membranproteine sehr hydrophob und lipophil. Das gängigste Tensid, mit dem man solche Proteine selektiv solubilisieren kann, ist das in den vorangegangenen Versuchen verwendete LDAO. Es ist jedoch gleichzeitig durch seine Aminoxidgruppe ein, wenn auch nicht starkes, Oxidationsmittel. Dies ist auch eine Erklärung dafür, daß man in den vorher beschriebenen Versuchen oft spektroskopisch Bchl b_{ox}. vorfand. Weiterhin ist bekannt, daß z.B. die RCs von *Rsp. rubrum* sehr empfindlich gegenüber LDAO sind (Snozzi und Bachofen, 1979). Deshalb wurde im folgenden versucht die Membran von *E. halochloris* mit anderen Tensiden zu dissoziieren. Die RCs von *Rsp. rubrum* G-9 ließen sich z.B. mit T-BG10, T-H66 oder R-B204 stabilisieren (Gottstein, 1984).

Zu Chromatophoren wurde deshalb 1% der unten angegebenen Tenside gegeben und diese dann auf kleinen DEAE Säulen (Pasteurpipetten) fraktioniert. Dabei wurden, in alphabetischer Reihenfolge) die folgenden Detergentien verwendet (eine nähere Charakterisierung ist im Anhang dieser Arbeit gegeben); gleichzeitig ist das 1020/800nm Verhältnis der mit 0.15M NaCl von den Säulen eluierbaren Fraktion angegeben, sowie der ionische Charakter des verwendeten Tensids:

Tensid	A _{1020/800}	A _{1020/800} nach 48h
B 30 (nicht ionisch)	1.70	1.80
B 56 (nicht ionisch)	2.00	2.00
B 58 (nicht ionisch)	2.00	2.00
Laurylsarkosin (anionisch)	1.28	1.40
R-AM 2L (amphoter)	1.87	1.77
R-AM-V (amphoter)	1.70	1.85
R-B204 (nicht ionisch)	1.65	1.57
R-DL 203/S (nicht ionisch)	2.06	2.05
R-IPL 203 (nicht ionisch)	2.10	2.13
R-NP 90 (anionisch)	1.90	1.95
R-OP 90 (anionisch)	1.90	2.18
R-PO (nicht ionisch)	1.94	1.96
Tween 60 (nicht ionisch)	2.10	2.08
T-BG 10 (anionisch)	1.75	1.76
T-DF 12 (nicht ionisch)	1.51	1.55
T-DF 16 (nicht ionisch)	1.59	1.66
T-H 66 (anionisch)	1.82	1.84
T-QS 44 (anionisch)	1.92	2.02
T-X 45 (nicht ionisch)	1.51	0.92
T-X 100 (nicht ionisch)	2.00	1.70

Bei den folgenden Tensiden (Konzentration ebenfalls 1%) zeigte sich hingegen nur noch ein Peak um 800nm, der nach nochmaligem Messen (t ca. 5min), zugunsten eines 680nm Produkts verschwand: LDAO, CTAB, R-AM DML und LDS. Durch R-Sulfonsäure, als dem letzten Tensid, wurde die Probe vollständig zerstört und eine spektrale Zuordnung zu irgendeiner bekannten Struktur war nicht möglich.

1.3.5. Zusammenfassung der Chromatographie Versuche

Keine der angegebenen Methoden war geeignet RCs aus der Membran von *E. halochloris* anzureichern. Dabei spielten wohl v.a. zwei Aspekte eine Rolle:

1. Durch Zusatz destabilisierend wirkender Detergentien ließ sich spektroskopisch nur noch Bchl b_{ox} nachweisen, wohl deshalb, weil dadurch Bchl b einem Zutritt von O_2 zugänglich wurde.
2. Durch stabilisierend wirkende Detergentien wurde die Membran zwar solubilisiert aber nicht dissoziiert, sodaß auch auf diese Weise keine RC Anreicherung möglich war.

Während die RCs von *Rp. viridis* durch LDAO, auch in so hohen Konzentrationen wie 5% (Michel, 1982), nicht zerstört werden, ist das RC von *E. halochloris* in dieser Hinsicht viel labiler. Dies läßt sich evtl. mit einer größeren Exponiertheit des Bchl b im RC von *E. halochloris* erklären, sodaß es dort einem Zugriff von außen (etwa durch O_2 , wie unter 1 oben diskutiert) besser ausgesetzt ist.

Die Ergebnisse mit den unterschiedlichen Tensiden gaben ebenfalls keinen Aufschluß über eine mögliche RC Anreicherung, sondern sie scheinen entweder den ganzen Photosyntheseapparat zu stabilisieren oder ihn vollständig zu zerstören.

2. Ultrazentrifugation im Dichtegradienten

Eine brauchbare Methode für die Anreicherung, wenn auch nicht Reinigung photosynthetischer RCs aus Rhodospirillaceen ist die Ultrazentrifugation im Saccharose Dichtegradienten (Cogdell, pers. Mitt.). Die folgenden Versuche wurden deshalb in einem solchen von 0 - 1M Saccharose in Tris Puffer pH = 7.5 durchgeführt. Die Laufzeit betrug 90min bei 200000g.

Generell wurde dabei das Ausbleichen bei 980nm als Kriterium für eine RC Anreicherung angesehen. Um sicher zu gehen, daß kein Chinon verloren gegangen ist, wurde zusätzlich noch Chinon bei den Ausbleichmessungen zugesetzt.

2.1. Variation des zur Dissoziation eingesetzten Tensids

Wie bei 1.3.4. (s.S. 73) wurden die oben angegebenen Tenside verwendet und jeweils 1% Detergens zusammen mit 1ml Chromatophoren ($E_{1020}=50$; 1cm Küvetten) auf den Gradienten aufgetragen. Vom Prinzip erhielt man die gleichen Ergebnisse, wie sie bereits oben dargestellt worden waren. Die Membran wurde zwar augenscheinlich in mehr oder weniger große Bruchstücke zerlegt, die sich im Dichtegradienten auch trennen ließen, dabei war jedoch keine Fraktionierung zu angereicherten RCs zu erkennen.

2.2. Variation der Tensidkonzentration

Die entscheidende LDAO Konzentration liegt augenscheinlich zwischen 0 und 1%. Deshalb wurden Chromatophore mit steigender LDAO Konzentration in folgenden Stufen versetzt: 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.3%. Anschließend wurde die Probe auf einen Dichtegradienten, wie oben beschrieben, aufgetragen und 1h bei 200000g zentrifugiert.

Auch auf diese Weise gelang es jedoch nicht eine RC angereicherte Fraktion zu erhalten.

2.3. Stabilisierung durch NaCl

E. halochloris ist ein sehr halophiles photosynthetisches Bakterium. Als intrazelluläres Osmotikum konnte Betain nachgewiesen werden (Galinski und Trüper, 1982). Im Anzuchtmedium selbst befindet sich ca. 15% NaCl. Deshalb wurde vermutet, daß sich diese hohen Osmolaritäten auch auf die RC Präparation auswirken könnten. Durch den Zusatz von NaCl sollte das RC also möglicherweise stabilisiert werden können. Die Tabelle der folgenden Seite zeigt den auf die Dichtegradienten aufgetragenen Ansatz. Die Zentrifugation erfolgte w.o.

LDAO	NaCl
0.5%	100mM
1.0%	100mM
1.5%	100mM
2.0%	100mM
0.5%	200mM
0.5%	400mM
0.5%	600mM
0.5%	1000mM

Es läßt sich generell sagen, daß es nicht möglich war das RC von *E. halochloris* durch Zugabe von NaCl zu stabilisieren

2.4. Stabilisierung durch Zusatz von Deriphat

Der Zusatz von Deriphat 160C stabilisierte die RCs von *Thiocapsa pfennigii* (Seftor und Thornber, 1984). Deshalb wurde 1.2% Deriphat 160C und steigende Mengen CTAB (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%) sowie LDAO (0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1.2%) zu Chromatophoren gegeben und wieder eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

Auch auf diese Weise ließ sich jedoch kein RC anreichern.

2.5. Steigerung der Tensidkonzentration

Durch doppelte Extraktion sollte es möglich sein, das RC im Dichtegradienten in den Überstand zu bringen (Cogdell, pers. Mitt.). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, mehrere Male mit wenig Tensid heranzugehen, anstelle einmal eine hohe Konzentration zu verwenden. Das Pellet wurde also wieder resuspendiert und erneut mit Detergens behandelt. Die folgende Tabelle gibt darüber Auskunft. Auch war es auf diese Weise möglich, mit verschiedenen Detergentien an die Membran heranzugehen.

1. Zentrifugation	2. Zentrifugation
0.25% LDAO	0.30% LDAO
0.25% LDAO	0.25% LDAO
0.25% LDAO	0.20% LDAO
0.25% LDAO	0.15% LDAO
0.25% LDAO	0.10% LDAO
0.25% LDAO	1% T-X 100
0.25% LDAO	2% T-X 100
0.25% LDAO	3% T-X 100
0.20% LDAO	0.20% LDAO
0.10% LDAO	0.20% LDAO

Obwohl die ganze Membran auf diese Weise solubilisiert wurde, zeigte sich auch in diesen Fällen keine RC Anreicherung.

2.6. Zusammenfassung der Zentrifugationsversuche

Obwohl durch Zugabe verschiedener Tenside eine Fraktionierung der *E. halochloris* Membran möglich war, zeigte keine dieser Banden einen Hinweis auf eine RC Anreicherung. Entweder tauchten spektroskopisch noch Formen auf, die die 1020nm Absorption zeigten, oder Oxidationsprodukte von Bchl b, die um 680nm absorbierten.

3. Sonstige Methoden

Da die obigen "normalen" Methoden bei der RC Isolierung von *E. halochloris* keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, wurde:

- versucht die Chromatophore saturierend zu bestrahlen, in der Hoffnung, daß nur das RC übrigbleibt;
- 1% LDAO zugesetzt und gewartet bis spektroskopisch die 1020nm Bande verschwunden war, und
- mit $K_3Fe(CN)_6$ versucht, die Antenne zu oxidieren.

Auch diese Versuche führten jedoch zu keinem brauchbaren Ergebnis.

4. Zusammenfassung

Es war mit den oben beschriebenen Methoden nicht möglich das RC von *E. halochloris* zu isolieren. Deshalb sollen die aus ganzen Chromatophoren gewonnenen Ergebnisse noch einmal zusammengestellt werden:

1. Das RC zeigt ein Absorptionsmaximum bei 980nm.
2. Es besteht aus 4 Polypeptiden (34, 28, 26 und 17 kDa).
3. Es ist gegenüber einer Oxidation sehr empfindlich.

Weitere Versuche, wie sie derzeit von B. Kalomenos ausgeführt werden, sollen vor weiteren Isolierungsversuchen zunächst die Eigenschaften von Reaktionszentren in der Membran weitergehender charakterisieren.

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LICHTSAMMLER-CHLOROPHYLL-
PROTEINE VON E. HALOCHLORIS

1. Präparation

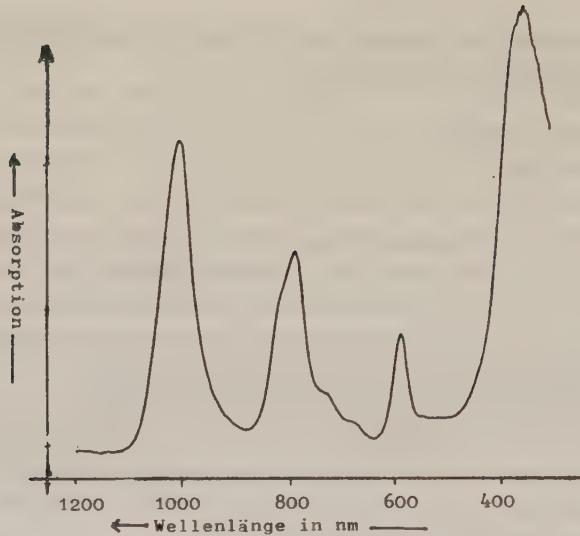
Wie bereits erwähnt wurde, lassen sich die Pigment Komplexe der Chromatophorenmembran mit Hilfe verschiedener Tenside unterschiedlicher Konzentration solubilisieren. Die mit Triton X-100 isolierten Fraktionen zeigten dabei dasselbe 1020/800nm Verhältnis wie die ganze Membran. Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf dieses Tensid.

Die Präparation wurde bereits auf S. 17 beschrieben. Im Prinzip wurde die Membran mit Triton X-100 inkubiert und der Überstand einer Ultrazentrifugation auf DEAE Zellulose fraktioniert. Mit steigender NaCl Konzentration ließen sich folgende Fraktionen von der Säule isolieren:

- ohne NaCl —————> freies, solubilisiertes Bchl b,
das ungewöhnlich stabil war und,
auch nachdem es 24h lang in Lösung bei 4°C stehen gelassen worden war, noch das ursprüngliche Absorptionsspektrum zeigte.
- 0.15M NaCl —————> Antennenfraktion
- 0.30M NaCl —————> "größere Bruchstücke"; also einfach
in größere Einheiten zerfallene
Membranen, deren Absorptionsspektrum dem ganzen Chromatophore entsprach (s.u.).

2. Absorptionsspektrum der Antennenfraktion

Auf der nächsten Seite ist das Absorptionsspektrum der mit 0.15M NaCl eluierbaren Antennenfraktion angegeben. Es entspricht demjenigen, das man auch von ganzen Chromatophoren erhält.



In der folgenden Tabelle sind die Absorptionsmaxima sowie die relativen Intensitäten der Extinktionen zusammengefaßt.

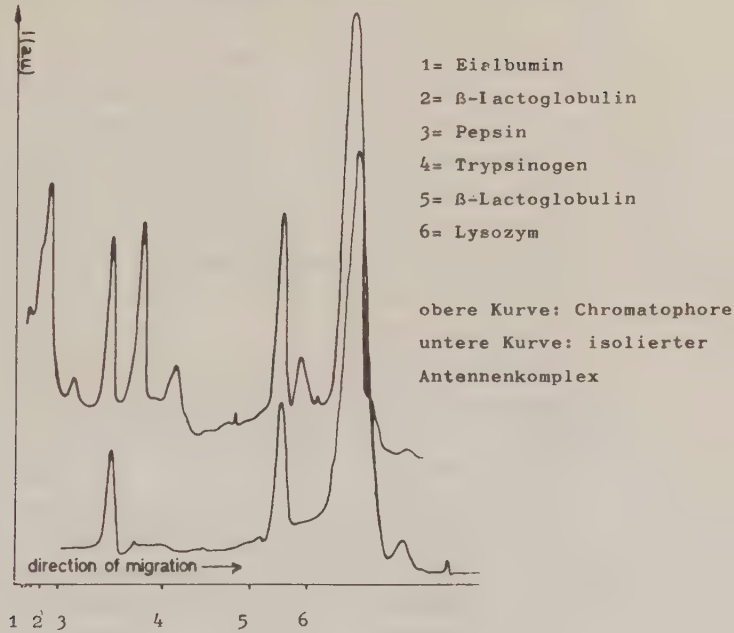
1020	sh.830	800	600	392	max. Absorption (nm)
1.0	-	0.66	0.41	1.44	A_{λ}/A_{1020} (relative Intensität)

Es lassen sich keine Carotinoide erkennen (Absorptionsmaximum 450-550nm); ebenfalls läßt sich keine exakte Aussage über das Vorliegen von Bphe b machen (Qx-Bande etwa bei 530nm). Die einzige, deutlich ausgeprägte Qx-Bande liegt bei 600nm und gehört zum Bchl b. Die Soretbande ist im Vergleich zum Spektrum von Bchl b in Ether (s.S. 7) unverhältnismäßig groß und zeigt keine Aufspaltung in eine Bx und By Komponente. Außerdem fällt auf, daß kein oxidiertes Bchl b (Absorptionsmaximum um 680nm) vorhanden ist.

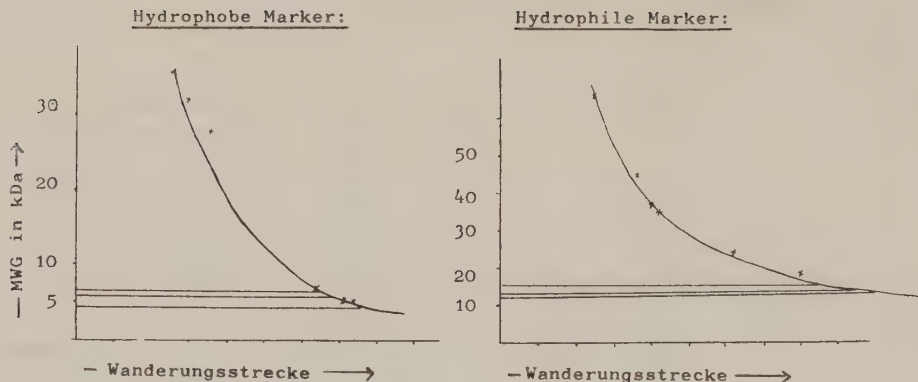
2. SDS-Gelelektrophorese

Die folgende Abbildung zeigt den Scan einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer Antennenfraktion im Vergleich zu der ganzen Chromatophore. Es muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß die mit 0.30M NaCl eluierbare Fraktion das gleiche Muster

im SDS-Gel zeigt, wie ganze Chromatophore.



Beide, 0.30M Fraktion und Chromatophore, zeigen vier höhermolekulare Peaks, die den RC Polypeptiden zugeordnet werden (34, 28, 26 und 17kDa). Im niedermolekularen Antennenbereich tauchen drei Peaks auf, deren MWGs im Vergleich zu einem Antennenstandart aus *Rp. sphäroides* bei 6.5, 6.0 und 4.5kDa liegen. Diese Werte sind realistischer, als jene, die man beim Vergleich mit hydrophilen Markern erhält. Benützt man nämlich die in der obigen Abbildung angegebenen Proteine als Marker, dann liegen die MWGs immer zu hoch (verleiche aber S. 68). Die folgenden Kurven zeigen die MWGs, wie sie einmal mit hydrophilen und einmal mit hydrophoben Markern gewonnen wurden.



Die folgende Tabelle vergleicht die gewonnenen Ergebnisse miteinander:

Hydrophobe Marker	Hydrophile Marker
6.500	13.500
6.000	13.000
4.500	12.200

(Angaben in Dalton)

Der Gelscan der Antennenpräparation (0.15M NaCl Fraktion) zeigt diese drei niedermolekularen Banden. Daneben fällt eine zusätzliche höhermolekulare auf, die der H Untereinheit des RC zugeordnet wird. Auf die oben beschriebene Weise war es nicht möglich, die Antenne ohne dieses H-Peptid zu isolieren. Dies ist insofern erklärbar, als dem H Peptid auch bei anderen Bakterien eine gewisse "Linkerfunktion" zwischen der Antenne und der L und M Untereinheit des Rcs zukommt. Verschiedene an anderen Bakterien gewonnenen Erkenntnisse unterstützen diese Vermutung:

1. Crosslinking-Experimente (Takemoto et al, 1982; Peters und Drews, 1983) zeigten, daß sich "H" besonders leicht sowohl mit der Antenne, als auch mit der M und L Untereinheit des RC (Wiemken et al, 1981; Bachmann und Takemoto, 1983) verbindet.
2. "H" enthält kein Bchl (Feher und Okamura, 1978).
3. Durch LiClO_4 oder SDS und LDAO ließ sich "H" vom RC abtrennen; die photochemische Aktivität ist auf LM beschränkt (Agalidis und Reiss-Husson, 1983; Feher und Okamura, 1978).
4. Durch Protease Abbau von *Rsp. rubrum* G-9 RCs ließ sich zeigen, daß, obwohl "H" schon weggedaut war, die photochemische Aktivität noch erhalten blieb (Wiemken und Bachofen, 1984).

Die kleineren Peptide, wie sie auf S. 82 angegeben wurden, lassen sich mit den Antennenpeptiden von *Rp. viridis* vergleichen (Jay et al, 1983). Daneben tauchten aber immer zwei höhermolekulare Banden auf, eine schwache bei 15.5kDa und eine starke bei 28kDa. Die schwache Bande ist mit *Rp. viridis* nicht vergleichbar, bei *Rp. capsulata* wird jedoch ein Peptid dieser Größenordnung der Antenne zugeordnet (Peters und Drews, 1983). Die 28kDa Bande kann der H Untereinheit des RCs zugeordnet werden (s.o.) und wird in diesem Falle mit der Antenne isoliert. Man könnte jedoch auch daran denken, daß es sich im Prinzip nicht um die H Untereinheit des RCs handelt, dann würde aber das RC von *E. halochloris* ein sehr ungewöhnliches Peptidmuster zeigen. Zum Schluß sei noch erwähnt, daß es sich in diesem Fall um die erste Antennenpräparation eines Bchl b haltigen Organismus handelt.

Zwei präparative Schwierigkeiten müssen in diesem Zusammenhang noch diskutiert werden:

1. Die beiden größeren Antennenpeptide (6.5 und 6.0kDa) ließen sich häufig nicht befriedigend trennen. Dies scheint jedoch auch bei anderen Präparationen ein Problem zu sein (Peters und Drews, 1983).
2. Die kleinste Einheit (4.5kDa) ließ sich mit Comassie Blau nur schwer anfärben, was wiederum einen Vergleich mit dem γ -Peptid von *Rp. viridis* zuläßt (Jay et al, 1983).

An dieser Stelle ist ein Vergleich der *E. halochloris* Antenne mit der verschiedener, anderer photosynthetischer Organismen recht aufschlußreich.

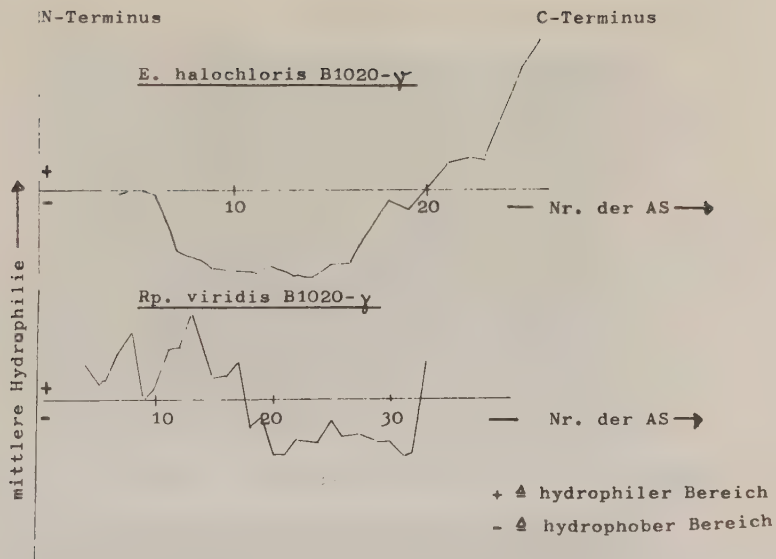
<i>E. halochloris</i>	<i>Rp. viridis</i> (Jay et al, 1983)	<i>Rp. capsulata</i> (Feick und Drews, 1979; Peters und Drews, 1983)	
		LH 1	LH 2
6.5	11.0	12.5	14.0
6.0	8.0	7.5	10.0
4.4	6.0		8.0

(Alle Angaben in kDa; die Werte von *E. halochloris* wurden mit hydrophoben Markern erhalten, wohingegen die Kalibrierung bei *Rp. viridis* nicht näher bekannt war.)

Die beiden Bchl b haltigen Organismen *Rp. viridis* und *E. halochloris* ähneln sich vom Peptidmuster sehr, zeigen jedoch deutliche Unterschiede in ihrer Aminosäurezusammensetzung (s.S. 85). Zudem ist zu bemerken, daß es bislang nicht gelang, den Antennenkomplex von *E. halochloris* zu fraktionieren, wie dies etwa bei *Rp. sphäroides* gelingt (Cogdell und Thornber, 1980). Wie bei *E. halochloris* das 6.5 kDa Peptid häufig nicht vom 6.0 kDa Peptid im SDS-Gel unterscheidbar ist, konnte auch bei *Rp. capsulata* die 7.5 kDa Einheit des LH 1 nicht von der 8.0 kDa Einheit des LH 2 unterschieden werden (Peters und Drews, 1983).

3. Aminosäuresequenz des kleinsten Antennenpeptids

Wie bereits im vorigen Kapitel aufgezeigt wurde, ähneln sich die beiden Bchl b haltigen Organismen *E. halochloris* und *Rp. viridis* in ihrem Peptidmuster. Dies gilt v.a. für das leichteste, schwer anfärbbare Peptid (4.5 kDa). Allerdings ist die bis jetzt bekannte Aminosäuresequenz (Brunisholz in Präp.) recht unterschiedlich. In der Abbildung der folgenden Seite sind die Hydropathie Kurven der beiden γ -Peptide angegeben und zusätzlich die ersten 29 Aminosäuren, wie sie durch Edman-Abbau erhalten wurden:



Aminosäuresequenz der 4.5kDa Antenneneinheit (B1020-γ) von *E. halochloris*:

Nf-MGDAGIVVAVLVILAILGWPNISSTLRW

Die mittlere Hydrophilie wurde dabei mit einer Fensterweite von sieben Aminosäuren ermittelt.

Während bei *Rp. viridis* erst ein hydrophiler Teil zu erkennen ist, der dann von einem etwa gleich großen hydrophoben Aminosäureanteil abgelöst wird, liegen die Verhältnisse bei *E. halochloris* genau umgekehrt. Zu Beginn treten deutlich hydrophobe Aminosäuren auf und erst am Ende des C-Terminus werden die Aminosäuren zusehends hydrophiler.

In beiden Peptiden findet sich kein Glutamin, Lysin und ebenso kein Histidin. Histidin wird aufgrund von Sequenzierungen verschiedener anderer Antennenpeptide (Brunisholz et al, 1984) und einer Röntgenstrukturanalyse (Mathews et al, 1979) als bindende Aminosäure für Bchl diskutiert, sodaß der Schluß gerechtfertigt erscheint, daß dieses Antennenpeptid kein Bchl enthält.

4. Verfolgung im Elektronenmikroskop

Kristalline Membranen lassen sich gut durch hochauflösende Elektronenmikroskopie charakterisieren. Dies trifft auf alle Bchl b haltigen Organismen zu und diese sind in letzter Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht worden. Die Membran von *Rp. viridis* ist dabei die am besten charakterisierte (Miller, 1979; 1982; Welte und Kreutz, 1982; Engelhardt et al, 1983; Stark et al, 1984). Es werden hexagonale Einheiten beschrieben, mit einem Durchmesser von etwa 130 Å, bei denen es sich um ein RC handeln soll, um das symmetrisch angeordnet Lichtsammel Chlorophyll Proteine liegen. Ein ähnliches Bild zeigt Engelhardt für die *E. halochloris* Membran.

4.1. Untersuchung von Membranfraktionen

Wie bereits auf S. 79 erwähnt wurde, ließen sich mit Hilfe steigender NaCl-Konzentration zwei unterschiedliche Proteinfraktionen von der DEAE-Säule eluieren. In Zusammenarbeit mit Dr. G. Wanner konnten diese elektronenmikroskopisch untersucht werden. Außerdem ließen sie sich mit denen undissoziierter Chromatophore vergleichen. Auf S. 87 sind die entsprechenden Abbildungen dargestellt.

Abb.1:

Undissoziierte Chromatophore von *E. halochloris*; diese wurden während der Präparation mit nur 50.000g abzentrifugiert (s.S. 17). Der Überstand wurde im UV spektroskopisch vermessen und zeigte einen typischen Peak bei 260nm, der auf Nucleinsäuren zurückzuführen ist. Man kann also sicher sein, daß auf diese Weise eine Abtrennung von Ribosomen gelang.

Man erkennt deutlich die übereinanderliegenden Membranstapel und die kristalline, hexagonale Anordnung derselben. Der ϕ der Einheitszelle (womöglich RC im Mittelpunkt umgeben von 6 -12?- LHCP) läßt sich mit etwa 135Å angeben. Dies stimmt gut mit Literaturwerten überein (Engelhardt et al, 1983).

Abbildung 1: Chromatophore von *E. halochloris*

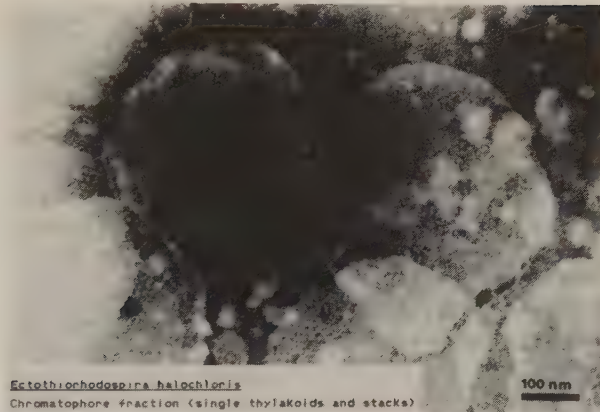


Abbildung 2: 0.30M NaCl Fraktion (größere Bruchstücke, s.S.79)

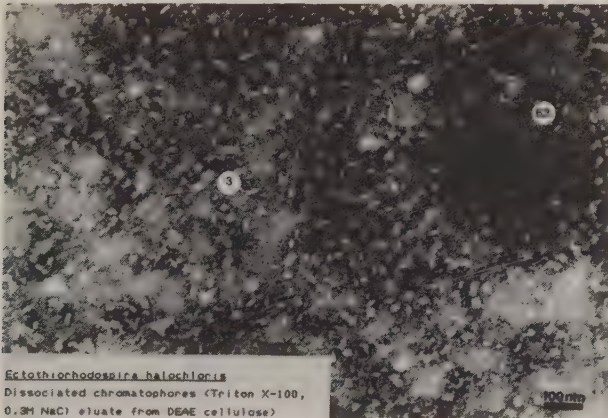


Abbildung 3: Beginnende Dissoziation der *E. halochloris* Chro-

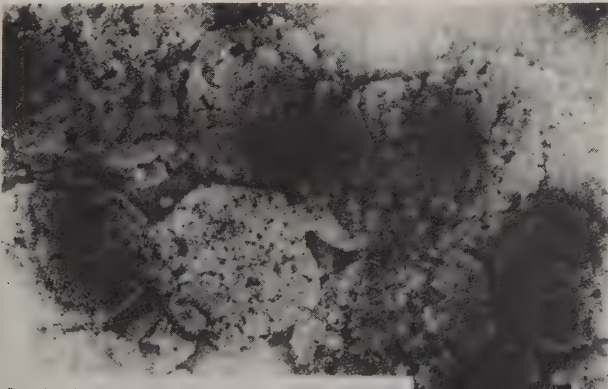


Abb. 2:

Hier ist die 0.30M NaCl-Fraktion zu sehen, also diejenige, die auf S. 79 als "größere Bruchstücke" bezeichnet worden ist. Man erkennt, daß die hexagonale Anordnung noch vorhanden ist, daß die Bruchstücke jedoch, verglichen mit undissoziierten Chromatophoren, deutlich kleiner geworden sind.

So sind einmal drei zusammenhängende, hexagonale Einheiten, und ein anders Mal 63 dieser zu sehen. Außerdem lassen sich keine "stacks" mehr erkennen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß das Absorptionsspektrum dieser Fraktion, ebenso wie das SDS-Gel, identisch mit ganzen Chromatophoren ist.

4.2. Elektronenmikroskopische Verfolgung der Dissoziation der Chromatophore

Integrale Membranproteine lassen sich i.A. nur mit Hilfe von Tensiden aus der Membran herauslösen. Wie oben gezeigt (s.S. 78), eignete sich bei dem halophilen Bakterium *E. halochloris* v.a. Triton X-100. Diese Dissoziation ließ sich gut im Elektronenmikroskop verfolgen. Dazu wurden Chromatophore mit verschiedenen TX-100 Konzentrationen versetzt und diese direkt im Negativkontrast betrachtet. Auf S. 87 sind die entsprechenden Aufnahmen gezeigt.

Man erkennt, wie die Membran oberhalb 0.3% TX-100 deutliche "Sprünge" erhält und wie sich schollenartig einzelne Bruchstücke ablösen. Man solubilisiert also nicht einzelne photosynthetische Einheiten, sondern größere Membranstücke. Die Membran reißt dabei nicht entlang bestimmter Vorzugsrichtungen, sondern man findet unregelmäßig verteilte "Sprünge". Deutlich läßt sich jedoch noch die hexagonale Anordnung erkennen (s.S.87, Abb. 3).

5. Der Helixgehalt der E. halochloris Antenne

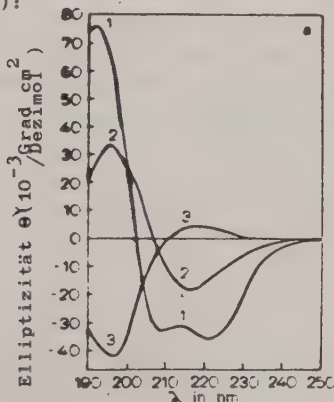
Da die Antenne von E. halochloris die erste Präparation eines Bchl b haltigen Lichtsammelkomplexes ist, ist es interessant die Sekundärstruktur näher zu kennzeichnen.

5.1. Theorie

Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen von Polypeptiden unterscheiden sich in der optischen Aktivität im Peptidbereich ($\lambda \approx 220\text{nm}$). Darauf aufbauend wurden CD Methoden ermittelt (Jirgensons, 1973; Hennessey Jr. und Johnson Jr., 1981). Dabei gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. Das Homopolymer Poly-L-Lysin läßt sich zu 100% in den folgenden Sekundärstrukturen darstellen (Greenfield et al, 1967): helikal (wobei dieser Begriff ganz allgemein gefaßt ist), β -Faltblattstruktur und als letztes eine ungeordnete Struktur, die in der Literatur als "random coil" bezeichnet wird (Greenfield und Fasman, 1969). Ein Computerfit rechnet dann, bei welcher prozentualen Verteilung dieser drei Strukturen die Meßkurve eines Proteins die beste Übereinstimmung zeigt.

2. Hier dient nicht das obige Homopolymer als Standart, sondern verschiedene Proteine, deren prozentuale Sekundärstruktur durch Röntgenstrukturdaten bekannt ist. Man rechnet wieder mit Hilfe eines Computers auf 100% zurück und erhält so sehr ähnliche Spektren für reine Formen wie bei 1. (Saxena und Wetlaufer, 1971; Chen et al, 1972). In der folgenden Abbildung sind die CD-Spektren der Homopolymeren dargestellt (aus Greenfield und Fasman, 1969):



1. 100% Helix
2. 100% β -Faltblatt
3. 100% "random coil"

Die Helix zeigt dabei u.a. eine negative Bande bei 222nm. Diese wird verursacht durch die in der Absorption relativ schwachen, aber optisch sehr aktiven $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge der Peptidbindung. Bei der Reaktion mit Licht wird ein Elektron von einem nichtbindenden Orbital n in ein antibindendes π^* -Orbital angehoben. Dieser Übergang bewirkt eine circulare Bewegung des elektrisch induzierten, magnetischen Moments entlang der C=O Bindung. Die starke positive Bande bei 191nm und der negative Peak bei 205-210nm werden durch $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge verursacht. Beide Polarisationen stehen aufeinander senkrecht (Exciton-Kopplung). Die Kurven hängen jedoch auch von der Länge der Helix ab (Tinoco et al, 1963; Woody und Tinoco, 1967), zum anderen kommen Signale einzelner Gruppen hinzu, so zeigen Disulfidbrücken des Cysteins CD-Banden bei 195-200nm und bei 250-260nm und ebenso Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin solche zwischen 230 und 310nm. Ein weiterer Gesichtspunkt muß in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden: Die Daten der standardisierten Kurven stammen von hydrophilen, Wasser löslichen Proteinen, etwa Lysozym oder Myoglobin. Inwieweit auf dieser Grundlage der Rückschluß auf hydrophobe Membranproteine aussagekräftige Ergebnisse liefert, läßt sich erst beim Vorliegen entsprechender Röntgen- oder Elektronenbeugungsdaten sicher sagen. Beim Bakteriorhodopsin konnten jedoch befriedigende Übereinstimmungen gefunden werden (Jap et al, 1983).

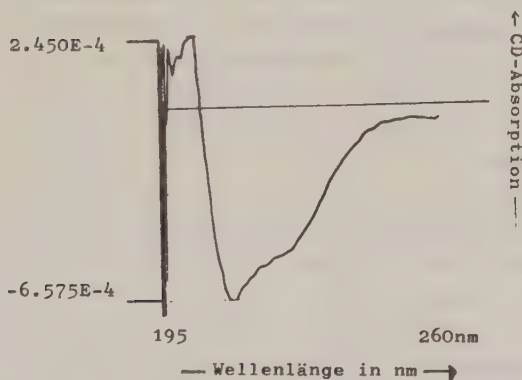
Zurück jedoch zum obigen Spektrum der Homopolymeren. Man kann erkennen, daß sowohl β -Faltblatt, als auch "random coil" bei 208nm nur eine geringe Elliptizität zeigen (etwa $-4000 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$; der Wert ist auf eine Aminosäure bezogen; entspricht Schnittpunkt beider Kurven). Die Helix zeigt in diesem Bereich ein Maximum von $-33.000 \text{ deg cm}^2/\text{dmol}$. Deshalb kann der prozentuale Anteil der Helix eines unbekannten Proteins in erster Näherung durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$\% \text{ Helix} = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33000 - 4000}$$

(aus Greenfield und Fasman, 1969)

5.2. Anwendung auf die E. halochloris Antenne

Das folgende Bild zeigt das CD-Spektrum, wie es im UV von der Antenne von E. halochloris aufgenommen werden konnte:



Lösungsmittel: 0.01M Tris, 0.1% B-56; pH= 8.0

Konz.: $E_{1020} = 0.45$ (1cm Küvetten)

Dabei wurde die Membran jedoch nicht mit Triton X-100 dissoziiert, da dessen aromatischer Ring im UV eine starke Absorption zeigt, sondern mit B-56, einem nicht ionischen Polyoxyethylenmonocetyether, der keinen aromatischen Ring mehr besitzt, aber ansonsten dem Triton X-100 sehr ähnlich ist.

Im SDS Gel und im Absorptionsspektrum stimmt diese Präparation mit der auf S.79ff erwähnten überein.

Mit der oben angegebenen Gleichung erhält man einen Helixgehalt von etwa 90%. Die Proteinkonzentration wurde dabei durch die Bio-Rad Methode, und die Methode von Lowry bestimmt. Dabei wurde jeweils über eine Serie von Parallelproben gemittelt. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß diese für hydrophobe Membranproteine keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, da die Streuung der Meßwerte sehr groß war.

Im Vergleich zu den Werten, die für andere Antennenpräparationen erhalten wurden, liegt der obige Wert um ca. 15% höher. Es müssen jedoch folgende Unsicherheitsfaktoren berücksichtigt werden:

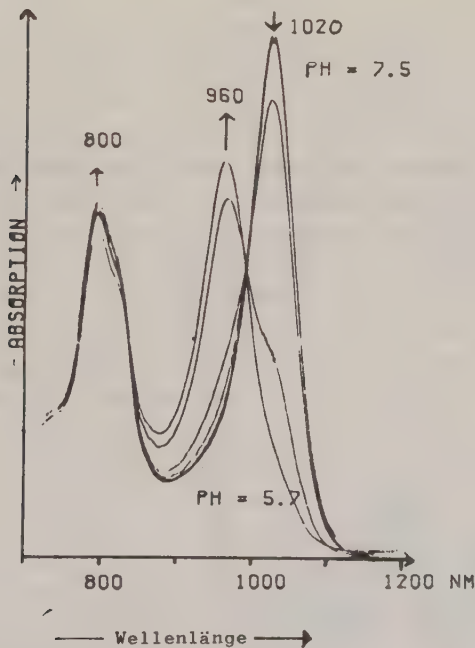
1. Die Proteinkonzentration hydrophober Membranproteine ist, wie oben gezeigt, mit den üblichen chemischen Methoden nicht befriedigend bestimmbar.
2. Die einzusetzende Elliptizität bezieht sich auf eine Aminosäure und auf die Schwierigkeiten der Kalibrierung im SDS Gel wurde schon hingewiesen.
3. Die hier diskutierte Antennenpräparation zeigt immer noch die "H" Untereinheit des RC.
4. Die Standartisierung erfolgte mit Hilfe hydrophiler Proteine (s.o.).
5. Auch einzelne Aminosäuren zeigen in diesem Bereich starke Signale. Hier spielen v.a. Tryptophane eine Rolle, da es keinen Hinweis auf Disulfide in Antennenkomplexen photosynthetischer Bakterien gibt (Brunisholz et al, 1984).
6. Auch Bchl b ist optisch aktiv, allerdings beträgt die Aktivität weniger als 15%, verglichen mit der über 250nm.

Es läßt sich jedoch festhalten, daß die Helix, als einzige der oben angegebenen Sekundärstrukturen, bei 208nm einen Peak zeigt, sodaß man durchaus davon ausgehen kann, daß der helikale Anteil im Antennenkomplex von *E. halochloris* sehr groß ist, und damit Ähnlichkeiten zu anderen Antennen bestehen (Brunisholz et al, 1984).

6. Absorptionsänderungen

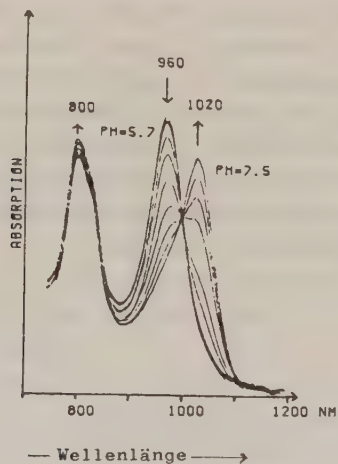
6.1. Absorptionsänderungen durch Säure

Wie bereits beschrieben, s.S. 17, wurde bei der Einstellung von Chromatophoren des halophilen Bakteriums *E. halochloris* Tris/HCl Puffer pH=7.5 verwendet. Titriert man nun eine Chromatophorensuspension mit Säure, so verschiebt sich das langwellige Absorptionsmaximum von 1020nm ("Hoch-pH" Form) zu 960nm ("Niedrig-pH" Form), wobei ein isosbesthischer Punkt bei 1000nm auftritt. Bei pH=5.7 ist dann nur noch die "Niedrig-pH" Form vorhanden. Das folgende Absorptionsspektrum macht diese Absorptionsänderung deutlich:

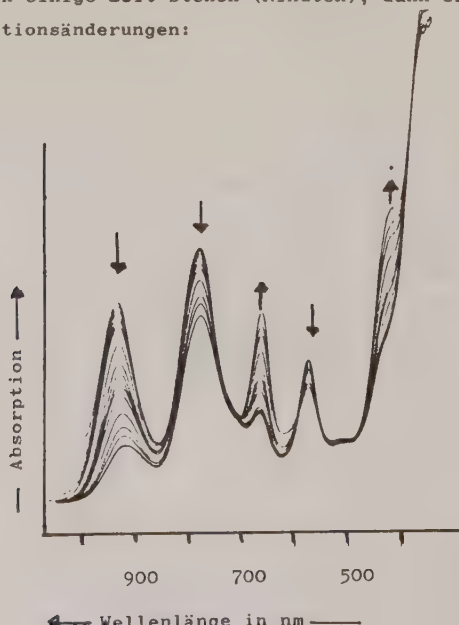


6.1.1. Reversibilität

Titriert man die "Niedrig-pH" Form sofort wieder mit Base (NaOH) zurück, so läßt sich die Ausgangssituation zu etwa 70% wieder herstellen, wie die folgende Abbildung zeigt:



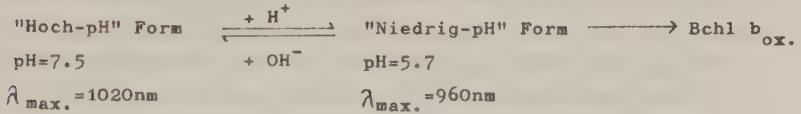
Daß keine 100%ige Reversibilität erreicht wurde liegt daran, daß die "Niedrig-pH" Form sehr instabil ist. Läßt man diese nämlich einige Zeit stehen (Minuten), dann erhält man folgende Absorptionsänderungen:



Die Pfeile geben wieder die Zu- bzw. Abnahme einer Bande an.

Wie man erkennen kann, nimmt die 960nm Bande ebenfalls ab und mit ihr auch die oben konstant gebliebene 800/830nm Absorption. Zusätzlich taucht ein Peak bei 680nm auf, die 600nm Bande geht zurück und die Soretbande wird langwelliger verschoben. Es bildet sich also oxidiertes Bchl b.

Die Verhältnisse lassen sich in folgendem Schema zusammenfassen:



6.1.2. Vergleich mit anderen Präparationen photosynthetischer Bakterien

Diese pH-abhängige Absorptionsänderung findet man sowohl bei Chromatophoren (inside-out Partikel), als auch bei Spheroplasten (rightside-out Partikel). Ebenso läßt sich das Absorptionsmaximum ganzer Bakterien und auch das der isolierten Antenne auf diese Weise reversibel verschieben, sodaß von einer B1020/800 und einer B960/800 Antenne gesprochen werden kann (B steht für "bulk", nach Photosynthesekongress Brüssel, 1983).

Im Vergleich dazu zeigt die Antennenfraktion B800/850 von Rp. sphäroides, welche ebenfalls ein doppelgipfliges NIR Spektrum, aber Bchl a enthält, eine beachtliche Stabilität gegenüber Säure. Die folgende Tabelle zeigt den Effekt von Säure auf die obige Antenne:

pH-Wert	A_{850}/A_{800}
7.5	1.34
1.7	1.70 (bei Rücktitration 1.30)
13.3	1.37

Hier ändert sich also das Intensitätsverhältnis der einzelnen Peaks um maximal 20% über 12 pH-Einheiten, dabei nimmt die 800nm Absorption schneller ab, als die 850nm Absorption. Eine Revertierung ist auch hier möglich (mit Base). Eine ebensolche Stabilität läßt sich auch bei anderen Proben feststellen. Die Chromatophore von *Rp. sphäroides* R 26 nehmen bei Protonenzugabe in ihrer langwelligsten Absorption um ca. 30% ab (Niedergang der 870nm Bande), lassen sich durch Zugabe von Base aber wieder auf den Ausgangswert zurückbringen. Chromatophore von *Rsp. rubrum* G-9, ebenso wie die von *Rp. viridis* oder isolierte RCs von letzterem werden nur insofern beeinträchtigt, als die Lösung trübe wurde. Durch Zugabe von NaOH ließ sich diese Trübung beseitigen, die Ausgangssituation wieder herstellen.

6.2. Versuche zur Proteinmodifizierung

Trägt man die normierte Abnahme der "Hoch-pH" Form und die Zunahme der "Niedrig-pH" Form gegen den pH-Wert auf, so erhält man als Wendepunkt beider Kurven den pH-Wert, der dem pKs-Wert entspricht. Er beträgt 6.3. Dies ließ die Vermutung zu, daß an dieser Umwandlung entweder Histidin (pKsca. 6.8) oder Carboxylseitenketten (pKsca. 4.7) beteiligt sind. Zum Test auf Histidin wurde versucht, dieses durch α -Brompropionsäure oder dem etwas hydrophoberen Methylester, der leichter in ein hydrophobes Protein eindringen sollte, zu modifizieren (Crestfield et al, 1963; Heinrikson et al, 1968) Dazu wurde 1% α -Br-propionat bzw. der Methylester in Tris-Puffer pH=7.5 gelöst und darin Chromatophore solubilisiert. Auch in diesen Lösungen ist jedoch eine Umwandlung durch Säure möglich, selbst dann zeigte sich noch keine Änderung, wenn man die α -Halogenverbindungen 12h lang inkubierte. Auf die Instabilität der "Niedrig-pH" Form wurde bereits hingewiesen (s.S. 94). Diese ließ sich weder durch Zusatz der chaotropen Salze NaClO_4 oder NaSCN verbessern, noch konnte man die Chromatophore durch Zusatz des Vernetzer Reagens Glutaraldehyd vor der "Umwandlung" schützen. Bei der Kondensa-

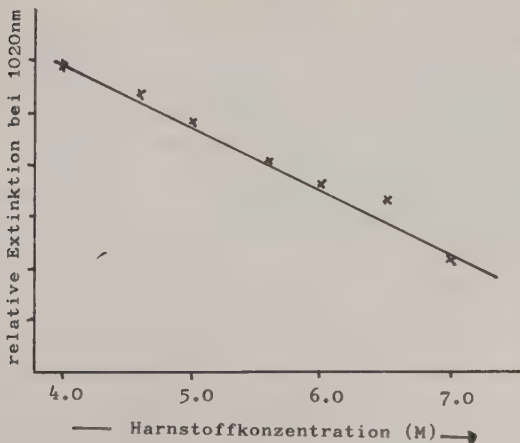
tion werden dabei Protonen frei und diese ließen sich auch in 1M Tris-Puffer nicht abpuffern. Eine Besetzung der Protonenbindungsstellen mit Ca^{++} gelang ebenfalls nicht.

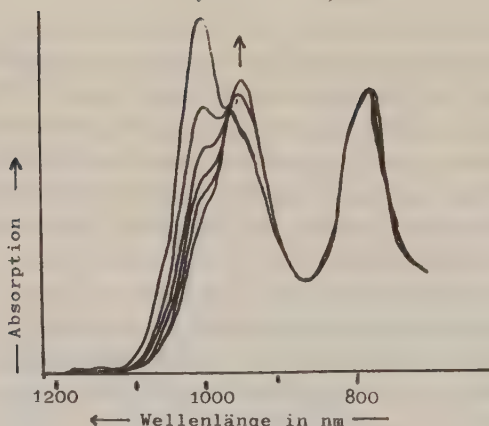
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es durch die oben angegebenen Methoden a. nicht gelang die Umwandlung 1020/960nm zu beeinflussen und b. war es auch nicht möglich die "Niedrig-pH" Form zu stabilisieren. Auch war die Umwandlung in allen Fällen durch Base noch revertierbar.

Obwohl die Modifizierung von Histidin nicht gelang, ist es dennoch möglich, daß die entscheidende Reaktion an dieser Aminosäure stattfindet; so könnte man etwa daran denken, daß Histidin durch andere Gruppen geschützt ist und deshalb die α -Halogenverbindungen keinen Zutritt haben (Zuber, pers. Mitt.).

6.3. Absorptionsänderungen durch Zugabe von Harnstoff

Durch Protonen werden die Proteine in ihrer hydrophilen Umgebung beeinflusst. Deshalb wurde versucht durch Titration mit Harnstoff einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Dazu wurden in Tris-Puffer pH=7.5 steigende Harnstoff Konzentrationen vorgelegt (2ml) und immer die gleiche Menge Chromatophore (40 μ l) zupipettiert. Das folgende Bild zeigt die dabei auftreten - de Absorptionsänderung, und die Graphik gibt Aufschluß über die Abnahme der 1020nm Absorption in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration (es ist wichtig, daß alle Spektren nach der gleichen Zeit - ca. 60sec - aufgenommen werden, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen).

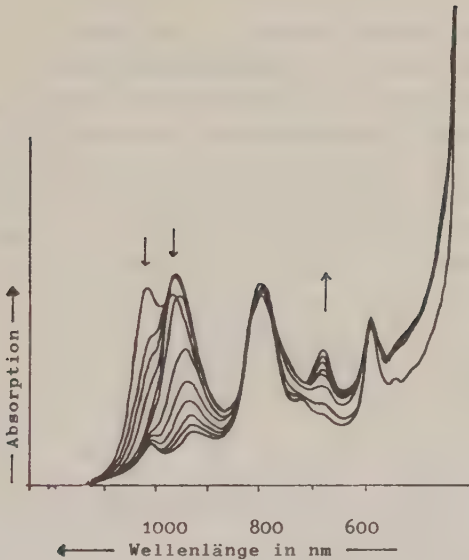




Auch hier zeigt die spektroskopische Verfolgung der Reaktion das Verschwinden der 1020nm Absorption und das Auftauchen einer neuen bei 960nm. Die Absorptionsänderungen sind mit denen identisch, die durch Säurebehandlung erhalten wurden. Auch in diesem Fall wird die 800nm Absorption nicht beeinträchtigt. Die gleichen Absorptionsänderungen wurden auch erhalten, wenn man Chromatophore in 5M Harnstoff Puffer (pH=7.5) und nach bestimmten, kurzen Zeitabständen (Minuten) immer wieder ein Spektrum aufnimmt.

6.3.1. Abhängigkeit der Harnstofftitration vom pH-Wert

Titriert man das durch Harnstoff erhaltene 960nm Produkt weiter mit Säure, so verschwindet auch der 960nm Peak. Er verschiebt sich dabei erst leicht kurzweilig zu 940nm, um letztlich ganz zu verschwinden. Die 800nm Bande verliert ihre typische Strukturierung, was mit dem Freiwerden von Bchl b erklärt werden kann; zusätzlich steigt der Peak bei 680nm, es wird also oxidiertes Bchl b frei. In der folgenden Abbildung sind diese Verhältnisse dargestellt. Es muß bemerkt werden, daß das durch Harnstoff erhaltene 960nm Produkt ungleich stabiler ist, als das durch Säure erhaltene.



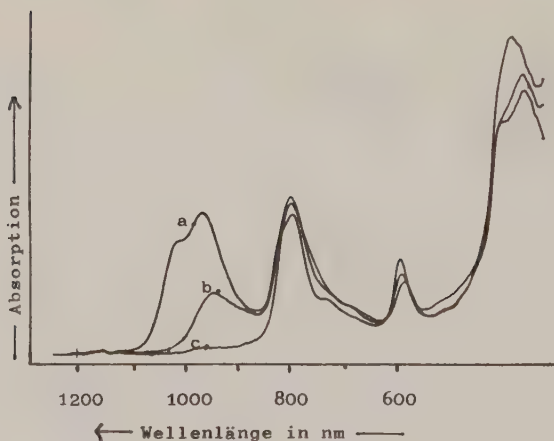
Man erkennt, daß bei der Titration und anschließenden kurzwelligen Verschiebung ein kleiner Peak bei 1020nm übrig bleibt. Dieser läßt sich nicht dem Spheroplastenanteil in der Chromatophorenpräparation zuordnen, da auch diese, wie oben gesehen, eine protoneninduzierte Absorptionsänderung aufweisen. Man könnte höchstens darüber spekulieren, ob Harnstoff die Zugänglichkeit für Protonen herabsetzt; auf der anderen Seite wäre auch ein Bchl b Pigmentkomplex denkbar, der für diese Absorption verantwortlich ist.

Es ist anzumerken, daß eine ähnliche kurzwellige Verschiebung von 960 nach 940nm auch bei der Alterung von *Rp. viridis* RCs beobachtet werden konnte (Hajek, 1981; Michel, pers. Mitt.).

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die säureinduzierte Absorptionsänderung durch Base reversierbar ist (s.S. 94). Deshalb wurden die Harnstofflösungen auch mit OH^- -titriert.

Die durch Harnstoff induzierbare Umwandlung 1020/960nm vollzieht sich in 8.8M Lösung bei pH=8.4 nur langsam, wohingegen bei pH=8.0 sofort das 960nm Produkt entsteht. Chromatophore sind also im basischen gegen Harnstoff unempfindlicher. Deshalb wurde versucht die Harnstoffwirkung durch Base zu reverteren. Die folgende Abbildung zeigt das zugehörige Absorptionsspektrum:

- a. Chromatophore in Tris, pH=8.0 + 8M Harnstoff
- b. Zugabe von 1 Tropfen 2N NaOH
- c. Zugabe eines weiteren Tropfens 2N NaOH



Chromatophore von *E. halochloris* wurden dazu in Tris-Puffer pH=7.5 + 8.0M Harnstoff gegeben; wie man deutlich erkennen kann, entsteht v.a. das 960nm Produkt. Gibt man einen Tropfen 2N NaOH zu, so erscheint wieder eine bei 940nm absorbierende Form (pH=13.5). Bei pH=14.0 ist die langwellige Absorption ganz verschwunden, die Strukturierung der 800/830nm Bande wird dadurch nicht beeinträchtigt. D.h. also, daß die durch Harnstoff induzierbare Absorptionsänderung nicht wie die durch Säure durch OH⁻ Ionen revertiert werden kann.

6.3.2. Problem der Reversibilität

Durch Chromatographie auf einer P6-Säule läßt sich Harnstoff aus einer Lösung entfernen.

Obwohl eine refraktometrische Vermessung nach der Säule zeigte, daß kein Harnstoff mehr vorhanden war, ließ sich keine exakte Aussage darüber machen, ob die Umwandlung auf diese Weise reversibel gestaltet werden kann, da die 960nm Form einfach zu instabil ist (obwohl die durch Harnstoff und durch Proteasen erhaltenen 960nm Formen -siehe später- stabiler sind, als die, die durch Säure erhalten werden konnte).

Während sich also die durch Protonen induzierte 960nm Form durch Base rücktitrieren läßt, ist die durch Harnstoff induzierte 960nm Form gegen OH^- instabil und kann nicht mehr rückgewandelt werden.

7. Absorptionsänderungen durch Zusatz von Proteasen

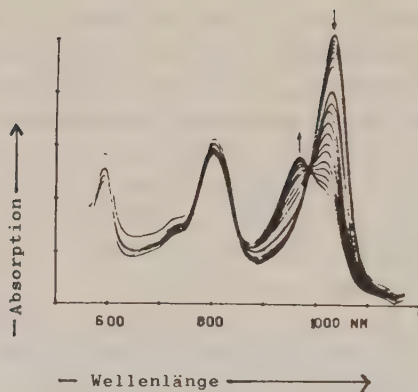
7.1. Theoretische Grundlagen

Bei der Titration von Membranfraktionen von *E. halochloris* mit Proteasen ließen sich die gleichen Absorptionsänderungen wie bei der Verwendung von Säure oder Harnstoff feststellen. Als Proteasen standen Proteinase K, Trypsin oder Thermolysin zur Verfügung.

Bchl b zeigt in organischen Lösungsmitteln ein langwelligstes Absorptionsmaximum bei 790nm, im Protein jedoch ein solches bei 1020nm. Das bedeutet, daß Teile des Peptids für die Rotverschiebung verantwortlich sein müssen. Diese können deshalb durch das Andauen mit Proteasen eine Konformationsänderung erfahren, bevor sie ganz verdaut sind.

7.2. Absorptionsspektroskopie

Das folgende Bild zeigt die Absorptionsspektren von Chromophoren von *E. halochloris*, die mit Trypsin titriert wurden:



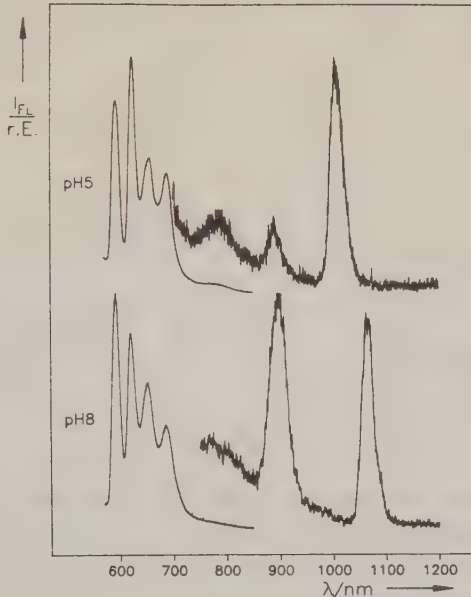
Die gleichen Absorptionsspektren konnten auch bei Verwendung der unspezifischeren Proteinase K oder mit Thermolysin erhalten werden. Man kann die oben erwähnte Absorptionsänderung also auch durch Proteasen induzieren (es wurde bei der Inkubation darauf geachtet, daß der pH-Wert der Lösung während der Inkubation nicht sauer wird!); es ist jedoch interessant, daß sie nur von der cytoplasmatischen Seite der Membran aus möglich ist, die Titration von Spheroplasten zeigte keine Absorptionsänderung.

8. Weiter Charakterisierung der 1020 und 960nm Form

Die bislang gewonnenen Ergebnisse wurden alle mit Hilfe von Absorptionsspektren erzielt. Es ist jedoch nun interessant, beide Formen durch Anwendung anderer Methoden näher zu charakterisieren.

8.1. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Sowohl von isolierten Antennenkomplexen, als auch von ganzen Chromatophoren wurden von Dipl. Physiker A. Angerhofer (Stuttgart) a. Fluoreszenzanregungsspektren und b. Emissionsspektren aufgenommen.

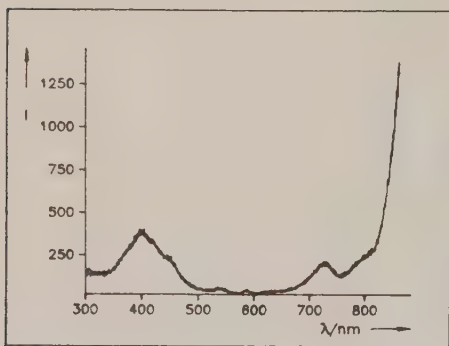


Die natürliche "Hoch-pH" Form zeigt eine Emissionsbande bei 1066nm (5K), die in der H^+ -induzierten "Niedrig-pH" Form zu 1007nm hin verschoben wird. Beide Proben zeigen unterhalb von 920nm das gleiche Anregungsspektrum, ein Hinweis darauf, daß von der Änderung nur die langwelligste Bande betroffen ist, die 800/830nm Bande ist bei diesen Temperaturen gut aufgelöst. Im Bereich unter 700nm zeigen sich die für Bchl b typischen Soret (~ 350 nm) und Qx-Banden (~ 600 nm).

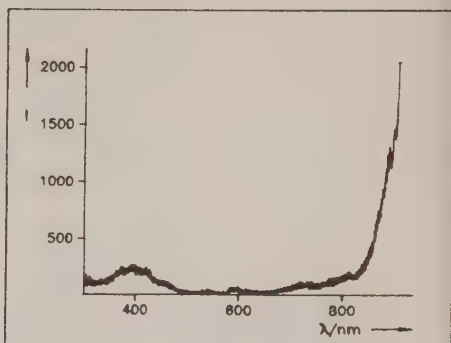
Da die relativen Intensitäten im Anregungs- und Absorptionsspektrum identisch sind, weist dies auf einen gut funktionierenden Energietransfer der Bchl b Chromophore, die um 830nm absorbieren, auf die hin, die längerwelliger als 900nm absorbieren.

Sowohl die "Niedrig-pH" als auch die "Hoch-pH" Form enthalten eine zusätzliche Emissionsbande um 900nm mit unterschiedlicher Intensität. Diese zeigt ein sehr unterschiedliches und ungewöhnliches Anregungsspektrum:

ANREGUNGSSPEKTRUM 894 NM



ANREGUNGSSPEKTRUM 934 NM

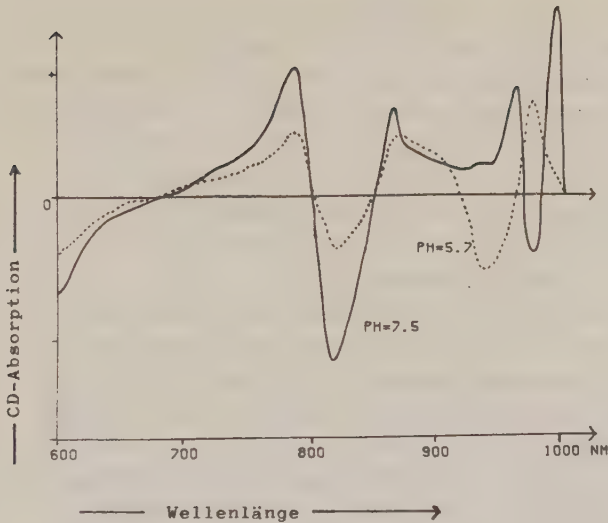


Man erkennt, daß die Qx-Bande im Bereich zwischen 500 und 600nm weitgehend verschwunden ist. Eine Komponente dieses Typs wurde in ganzen Zellen dieses und eines anderen Organismus (Rp. sphäroides) gefunden, und man nimmt an, daß es sich dabei um hyperchromische Bphe-Aggregate handelt (Scherz und Parson, in Präp.)

Die Emissions- und Excitationsspektren der mit Protease bzw Harnstoff behandelten Proben gleichen denen, die auch bei der Säurebehandlung erhalten wurden. Dies steht in Einklang mit den Absorptionsspektren.

8.2. Circulardichroismus

Sowohl die "Hoch-pH" als auch die "Niedrig-pH" Form können durch ihre CD-Spektren charakterisiert werden. Auf der folgenden Seite sind diese abgebildet.



Das CD-Spektrum der "Hoch-pH" Form zeigt im langwelligen Bereich unter 1010nm (limitierende Wellenlänge des Gerätes) ein recht komplexes Signal und um die 800nm einen M-förmigen Kurvenverlauf. Das Spektrum ist komplexer, als das von *Rp. viridis* Membranen und auch als das von Bchl *a* haltigen Organismen. *Rp. sphäroides* zum Beispiel zeigt nur ein einziges S-förmiges Dublett in ganzen Bakterien und in isolierten Antennenkomplexen (Sauer und Austin, 1978; Clayton und Clayton, 1981; Bolt et al, 1981) und auch *Chromatium* (Hayashi et al, 1981), *Rp. capsulata* (Bolt et al, 1981) und *Rp. palustris* (Hayashi et al, 1982) zeigen vergleichsweise einfache Signale. Die Komplexität spiegelt das komplexe Absorptionsspektrum von *E. halochloris* wieder. Sie kann entweder von einer starken Excitonenkopplung vieler Chromophore herrühren (Sauer, 1975), mindestens

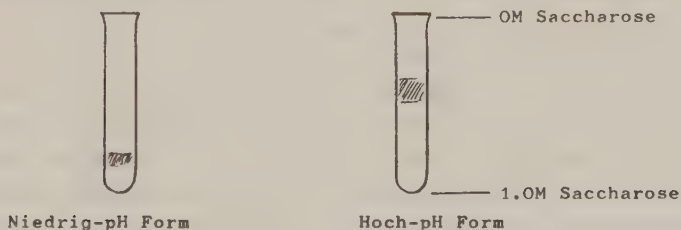
drei um 800nm und womöglich mehr als fünf über 900nm (CD-Signale geben immer nur ein Minimum der miteinander koppelnden Komponenten an), oder von einer Vielzahl isolierter, nicht koppelnder Chromophore, die in unterschiedlicher Umgebung sitzen. Es spricht jedoch einiges für den ersten Fall, da monomere Bchl_a nur sehr schwache Signale geben (Houssier und Sauer, 1969), die dann im Falle einer Aggregation stark anisotrop und komplex werden, was auf Excitonenkopplung zurückzuführen ist (Gottstein und Scheer, 1983).

In der "Niedrig-pH" Form ist das Spektrum weit weniger komplex. Das Signal in der 800/830nm Region ändert sich wenig (dies entspricht der konstanten Absorption), nur reduziert sich seine Intensität auf etwa 60%. Die ursprünglich sehr komplexe Region über 900nm wird insofern einfacher, als ein S-förmiges Signal um 960nm auftritt. Auch hier nimmt die Intensität ab. Dieses Spektrum läßt sich durch zwei stark koppelnde Bchl_a erklären, die bei 960nm absorbieren und durch mindestens drei Pigmente in der 800/830nm Region. Dies weist auf eine neue Ordnung der Membran nach der Säurebehandlung hin, von einem hochgeordneten zu einem weniger, aber noch geordneten Zustand.

Eine mögliche Erklärung liefert das Bild, daß für die 1020 und die 800/830nm Bande zwei Bchl_a Proteinkomplexe verantwortlich sind, die in der "Hoch-pH" Form stark assoziiert sind. Hier lohnt sich wieder ein Vergleich mit dem Bchl_a haltigem Bakterium *Rp. sphäroides*, bzw dessen B880/850 Antennenkomplex, wo die beiden Absorptionsmaxima einem, bzw zwei Chromophoren zugeordnet werden (Cogdell und Crofts, 1978), die an zwei unterschiedliche Polypeptide gebunden werden. Das Spektrum und der Energietransfer dieses Komplexes ist sehr sensibel gegen verschiedene Behandlungen mit Tensiden (Cogdell und Valentine, 1983; Clayton und Clayton, 1981; Kramer et al, 1984). Jedoch spielt dabei Säure nicht die entscheidende Rolle. Zum Schluß sei noch erwähnt, daß die Harnstoff - bzw. Protease behandelten Proben das gleich CD-Spektrum liefern, also auch in dieser Hinsicht identisch sind.

8.3. Zentrifugation im Dichtegradienten

Das folgende Bild zeigt die Dichtegradienten Zentrifugation der "Hoch-pH" (pH=9.0) und der "Niedrig-pH" (pH=5.0) Form:



Die ermittelten Dichten sind im folgenden angegeben:

"Hoch-pH" Form: = 1.04

"Niedrig-pH" Form: = 1.08

Man erkennt, daß die "Niedrig-pH" Form dichter ist, als die "Hoch-pH" Form.

9. Zusammenfassung

Aus dem Bchl b haltigen Organismus *E. halochloris* ließ sich eine Antennenfraktion B800/1020 isolieren. Somit stand zum ersten Mal eine Bchl b haltige Antenne zur Verfügung. Sie besteht aus drei Peptiden (4.5, 6.0 und 6.5kDa) und zwei größeren Einheiten (15.5 und 28.0kDa), von denen die letztere der "H" Untereinheit des RC zugeordnet wurde. Dieser B800/1020 Komplex ließ sich durch Behandlung mit Säure, Harnstoff oder Proteasen in eine Form B800/960 überführen. Diese Umwandlung ließ sich auch fluoreszenz- und CD-spektroskopisch untersuchen. Vor allem die CD-Daten deuten dabei darauf hin, daß es zu einem Entkoppeln der um 800nm absorbierenden Chromophore von denen kommt, die längerwelliger absorbieren.

TOPOLOGIE DER E. HALOCHLORIS MEMBRAN

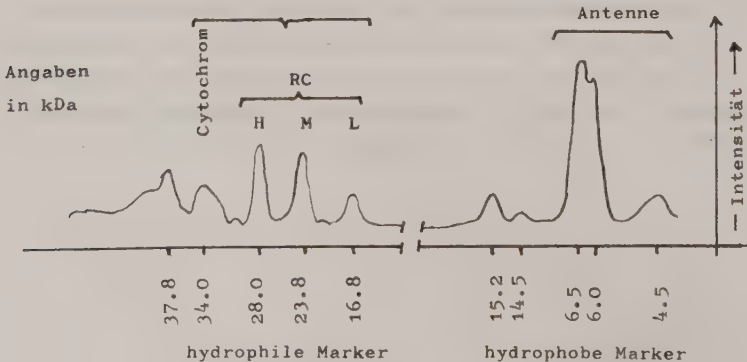
Auf S.102 wurde bereits die durch Trypsin induzierbare Absorptionsänderung 1020 - 960nm dargestellt. Diese Verschiebung erhält man nur mit Chromatophoren, also mit inside-out Partikeln und nicht mit Spheroplasten (right-side-out Partikel). Bei letzteren konnte nur eine geringe Abnahme der 1020nm Absorption beobachtet werden, was als "Verunreinigung" der Spheroplasten mit Chromatophoren gedeutet wird.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurden abschließend Untersuchungen zur Topologie der Photosynthese Membran von *E. halochloris* durchgeführt. Dazu wurden, die durch Proteasen induzierten Absorptionsänderungen mit SDS-Gelen korreliert, um Aussagen über die Exponiertheit der verschiedenen Membranproteine machen zu können.

In der Literatur wurden verschiedene Ansätze herangezogen um die Topologie von Photosynthese Membranen näher zu charakterisieren, etwa Markierung mit Antikörpern (Reed et al, 1975), radiochemische Markierung (Zürrer et al, 1977), Photoaffinitäts Markierung (Odermatt et al, 1980), Vernetzungsexperimente (Peters et al, 1983; Takemoto et al, 1982; Peters und Drews, 1983) oder gezielter Abbau mit Proteasen (Oelze, 1978; Bachmann et al, 1981; Hall et al, 1978). Die meisten dieser Arbeiten beschäftigten sich mit Bchl a haltigen Organismen, etwa *Rsp. rubrum* (Tsuji et al, 1983; Wiemken et al, 1982) oder mit *Rp. sphäroides* (Valkirs und Feher, 1982).

1. Darstellung der ganzen Membran von *E. halochloris*

Im folgenden ist der Gelscan ganzer Chromatophore von *E. halochloris* dargestellt:



Die folgende Tabelle gibt die mittleren Molekulargewichte in kDa an und vergleicht die Werte mit denen, die für *Rp. viridis* erhalten wurden (Jay et al, 1983):

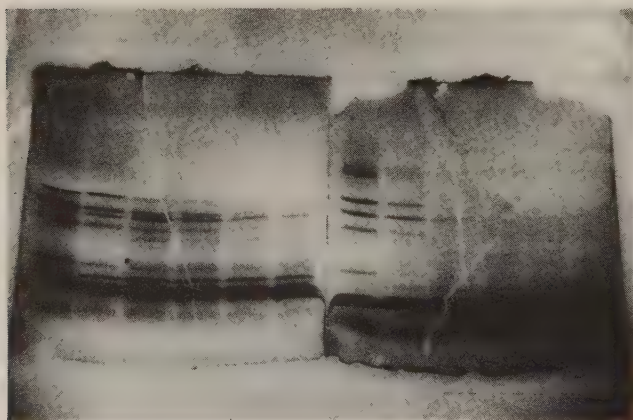
Rp. viridis		E. halochloris
38.0	Cytochrom	34.0
33.0	H	28.0
27.0	M	23.8
24.0	L	16.8
		15.2
		14.5
11.0		6.5
8.0	Antenne	6.0
6.0		4.5

Die leichteren fünf Werte wurden durch Kalibrierung mit hydrophoben Makern erhalten und sind somit nicht direkt mit denen von *Rp. viridis* vergleichbar. Ein Vergleich mit hydrophilen Markern wurde bereits auf S.82 diskutiert. Das 15.2kDa Peptid wurde mit der Antenne isoliert. Das 14.5kDa Peptid zeigte eine starke Fluoreszenz, die von oxidiertem Bchl b stammen könnte. Eine Fluoreszenzbande dieser Größenordnung findet sich auch bei *Rp. capsulata* (Feick, pers. Mitt.).

2. Proteolytischer Abbau

Die nach S.18 mit Proteasen inkubierten Proben konnten nun gelchromatographisch (s.S.19) untersucht werden. Da Trypsin durch SDS nicht inaktiviert wird, mußte das vollständige Abstoppen der Proteolyse durch Zugabe von Trypsininhibitor getestet werden. Dazu wurde Trypsin mit Trypsininhibitor zugegeben und anschließend dann Chromatophore; wenn die Reaktion vollständig gestoppt ist, sollte sich keine Veränderung im Gel, im Vergleich zu unbehandelten Chromatophoren zeigen, was auch

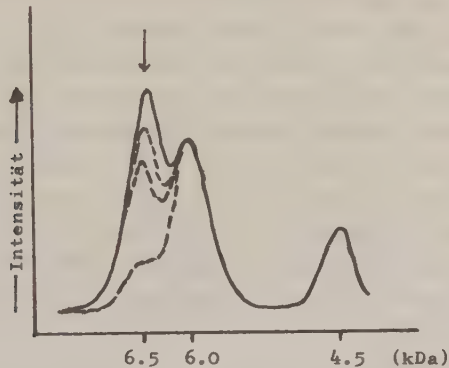
der Fall war. Im folgenden sind die SDS-Gele nach Inkubation mit Trypsin und Abstoppen mit Trypsininhibitor nach verschiedenen Zeiten abgebildet:



← 34.0kDa
 ← 28.0kDa
 ← 24.0kDa
 ← 17.0kDa
 ← 15.5kDa
 ← 6.5 und 6.0kDa
 ← 4.5kDa

Als erstes verschwindet die Cytochrombande; dies scheint überhaupt das labilste Peptid der Membran zu sein, denn zum einen fehlt es schon in Chromatophorenpräparationen, die mehrmals in Tris-Puffer gewaschen wurden, zum anderen ist es auch in Ultraschall behandelten Proben nicht zu finden. Die Cytochrombande ist jedoch im Vergleich dazu die stabilste in isolierten RCs von *Rp. viridis* (Michel, pers. Mitt.). Anschließend wird H abgebaut, dann L, wobei zwischen M und L eine neue Bande, ein Spaltprodukt, auftritt. Erst jetzt wird M abgebaut. Dies ist also die stabilste Untereinheit des RCs. Bei *Rp. capsulata* hingegen ist die L Untereinheit des RCs diejenige, die als letztes verdaut wird (Peters und Drews, 1984). Zwischen Antennen und RC Bereich tauchen dabei immer wieder Spaltprodukte auf. Erst wenn in dem Bereich über 10kDa keine Bande mehr zu

erkennen ist, wird auch die Antenne angegriffen. Im zweiten Gel ist zu erkennen, daß von den drei Antennenpeptiden die 6.5kDa Bande als erstes verschwindet, wohingegen die beiden leichteren Banden davon noch nicht beeinträchtigt werden. Deutlich kommt dies auch im Gelscan zum Ausdruck:



Als letztes verschwinden dann auch die beiden letzten Banden (Daten nicht gezeigt). Wegen der schwierigen Anfärbbarkeit der kleinsten Einheit (4.5kDa), läßt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, ob etwa eine Bande schneller, oder langsamer abgebaut wird.

Unterwirft man den isolierten Antennenkomplex der gleichen Behandlung, so verschwinden gleichmäßig alle Banden bei relativ geringer Protease Konzentration. Dies läßt sich durch die in diesem Fall bessere Zugänglichkeit des Enzyms erklären, die fixierte Anordnung in der Membran fehlt.

Versuche mit den beiden anderen Proteasen Thermolysin und Proteinase K zeigten entsprechende Ergebnisse. D.h. aber umgekehrt, daß, weil als Ausgangsmaterial inside-out Partikel verwendet wurden, diese Proteine auf der cytoplasmatischen Seite der Membran exponiert sein müssen.

3. Zuordnung Gel - Absorption

Der B800/850 Komplex von *Rp. capsulata* läßt sich ebenso durch Trypsin abbauen (Feick und Drews, 1979). Dieser enthält zwei Peptide, die im SDS Gel ein mittleres MWG von 10 bzw 8kDa zeigen. Anhand der gleichzeitigen Abnahme der 800nm Absorption läßt sich das 8kDa Peptid dieser zuordnen.

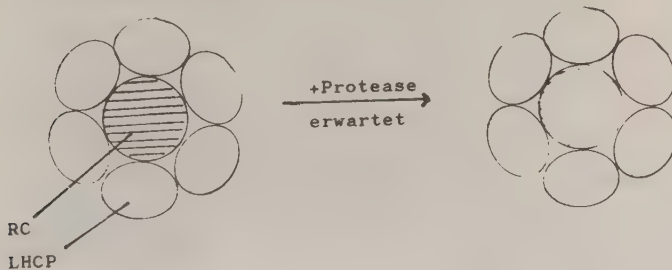
Bei *E. halochloris* liegt ein entsprechender Fall vor. Wie auf dem Bild auf S.102 zu sehen war, verschwindet die 1020nm Absorption bei Trypsinzugabe zugunsten einer neuen 960nm Bande. Die Abnahme der langwelligen Absorption läßt sich mit der Proteolyse des 6.5kDa Peptids korrelieren. Erst wenn im Gel die 6.5kDa Bande vollkommen verschwunden ist, erscheint im Spektrum nur noch ein 960nm Peak. D.h. also, daß für die 1020nm Absorption dasjenige Bchl b verantwortlich ist, das im 6.5 kDa Peptid sitzt.

4. Proteolyse an Spheroplasten

Die bisherigen Daten betreffen vor allem die Zugänglichkeit der cytoplasmatischen Membranseite. Um nun Aussagen über die periplasmatische Membranoberfläche machen zu können, wurden die gleichen Versuche mit Spheroplasten (rightside-out Partikel) durchgeführt. Die entsprechenden Trypsinmengen haben auf Spheroplasten überhaupt keinen sichtbaren Einfluß. Bei Verwendung von Proteinase K wird einzig die H Untereinheit des RCs abgebaut; diese muß also auch auf der periplasmatischen Membranseite herausragen und ist als einziges Membranpeptid von beiden Seiten verdaubar. Dazu müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden: Zum einen findet Michel im RC Kristall von *Rp. viridis*, daß die H Untereinheit, wenn überhaupt, nur sehr wenig auf der periplasmatischen Membranseite herausragt. Zum anderen ist von den Daten des Gels nicht auszuschließen, daß nur ein geringer Teil der H Untereinheit verdaut wird, der Rest dann aber auf einer anderen Bande liegt und so nicht mehr erkennbar ist. Es ließ sich jedoch keine deutliche Verstärkung irgendeiner anderen Proteinbande feststellen.

5. Verfolgung des proteolytischen Abbaus im Elektronenmikroskop

Die Proteasebehandlung von Chromatophoren des halophilen Bakteriums *E. halochloris* ließ sich auch im Elektronenmikroskop untersuchen. Abbildung 1 auf S. 114 zeigt Protease behandelte Chromatophore, die kein RC mehr enthielten. Geht man vom hexagonalen Bild der Photosyntheseeinheit aus, wie man sie in intakten Chromatophoren vorfindet und wie sie auch bei *Rp. viridis* beschrieben wurde (Stark et al, 1984), dann kann man annehmen, daß im Zentrum das RC sitzt, umgeben von 6 (oder 12?) Lichtsammelkomplexen.



Im einfachsten Fall wäre beim Verdauen des RCs ein leerer, hexagonaler Ring aus LHCP Komplexen zu erwarten. Tatsächlich findet man jedoch weniger geordnete Strukturen und wenn man die mit 0.30M NaCl von der DEAE Säule eluierbare Fraktion (s.S. 79) mit Protease behandelt (siehe S.114, Abb.2) erhält man spiralenförmige Einheiten.

Dies ließe sich damit erklären, daß das RC auf die Anordnung der Photosyntheseeinheit einen ordnenden Einfluß besitzt, dieser geht verloren, wenn es weggedaut ist. Jetzt kann man sich leicht vorstellen, daß sich der LHCP Ring öffnet und eine Neuorientierung stattfindet. Auf diese Weise sind die oben erwähnten, spiralenförmigen Strukturen erklärbar. Das folgende Schema soll diese Theorie noch einmal verdeutlichen:

Abbildung 1: Mit Proteinase K behandelte Chromatophore von *E. halochloris*. Obwohl die regelmäßige, hoch hexagonale Struktur un behandelter Chromatophore (s.S.87) nicht mehr so deutlich ausgeprägt ist, läßt sich dennoch ein gewisser Ordnungsgrad feststellen.

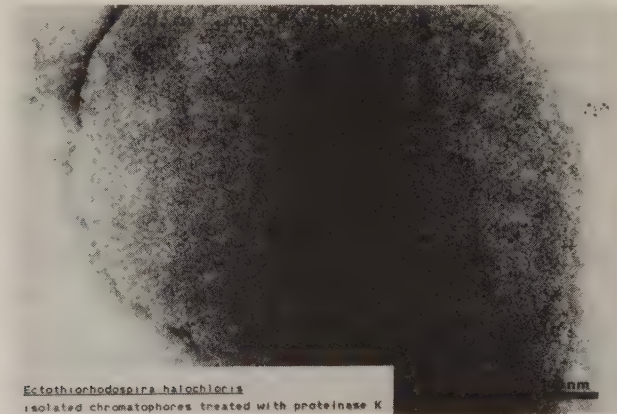
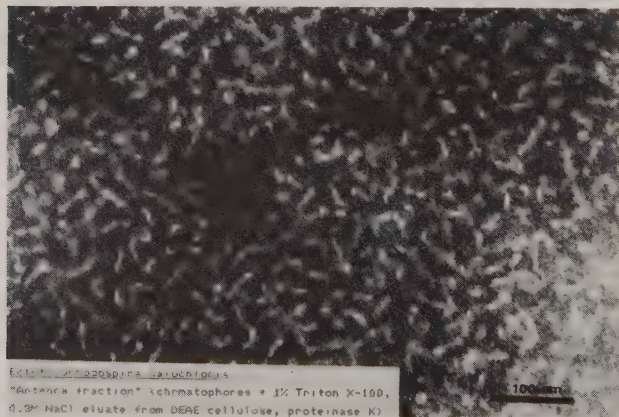
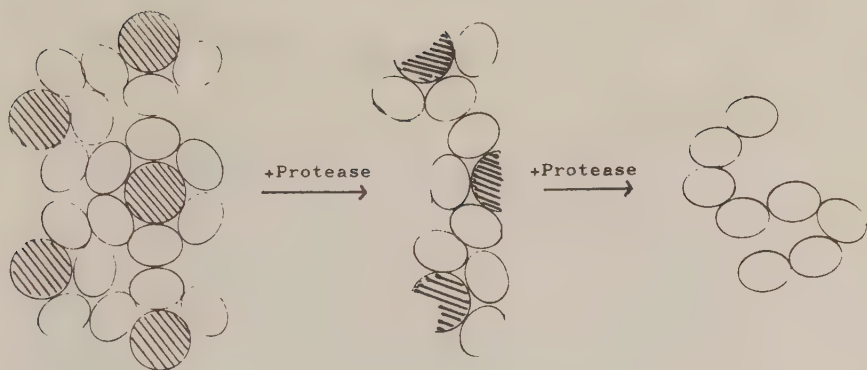


Abbildung 2: Mit Proteinase K behandelte 0.30M NaCl Fraktion. Das SDS-Gel zeigte, daß bereits der ganze RC Bereich (MWG 10kDa) verdaut war, die Probe bestand also nur noch aus den drei Antennenpeptiden: 6.5, 6.0 und 4.5kDa. Somit ging auch die ordnende Struktur der "H" Untereinheit verloren.





intakte Chromatophore

RC teilweise verdaut

Neuorientierung

Da man aber bei den isolierten Antennen noch eine größere Ordnung vorfindet (s.S. 87), muß angenommen werden, daß die "H" Untereinheit des RCs, die in obiger Antennenpräparation noch enthalten war, für diese Ordnung verantwortlich ist. Tatsächlich gibt es, insbesondere aus Quervernetzungsexperimenten, Hinweise auf eine "Stützpfeilerfunktion" der "H" Untereinheit bei anderen Bakterien.

Das Schema auf S.116 macht noch einmal deutlich, wie man sich die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zusammenfassend erklären kann. Ausgehend von undissoziierten Chromatophoren wurde dabei a. die Dissoziation durch Triton X-100, b. die Fraktionierung auf der DEAE Säule, sowie c. die Verfolgung des proteolytischen Abbaus berücksichtigt.

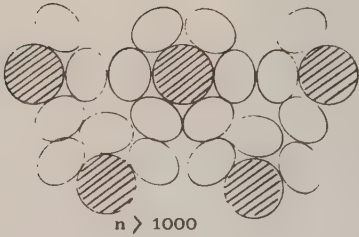


"unbehandelte" Chromatophore

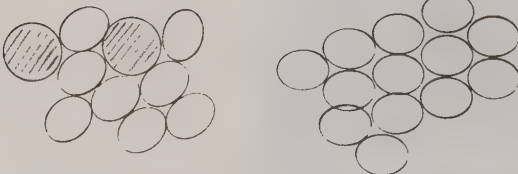
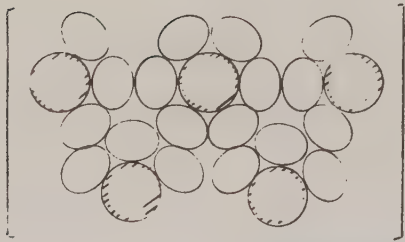
Triton X-100



Chromatophore
beginnende Dissoziation



Protease



beide Formen können elektronenmikroskopisch
nicht unterschieden werden

Rohe Antenne

DEAE -
Zellulose

freies Bchl b

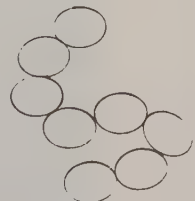
größere Bruchstücke

$n > 50$

Antennen

$n > 3$

Protease



Neuorientierung

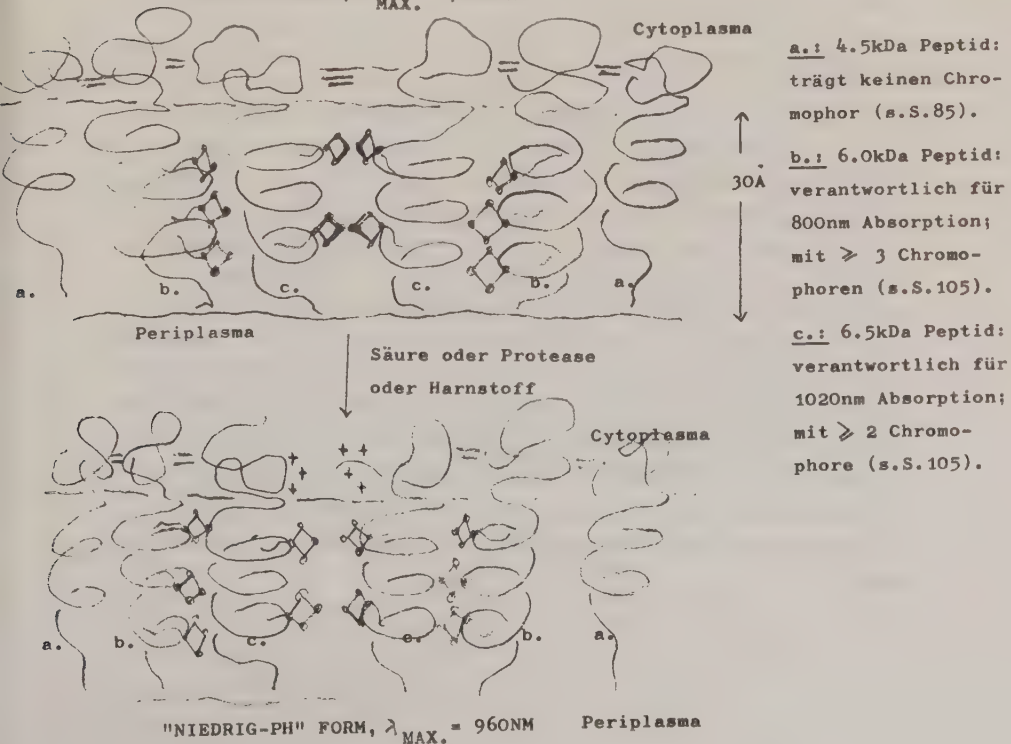
6. Aufstellen eines Membranmodells

Die biochemischen, elektronenmikroskopischen und spektroskopischen Ergebnisse ließen es zu, zwei sich ergänzende Modelle der Photosynthesemembran von *E. halochloris* aufzustellen. Im ersten wurde dabei vor allem der LHCP Komplex näher charakterisiert und die Anordnung der Peptide, sowie die Bchl-Organisation beschrieben; im zweiten dagegen wurde die Asymmetrie und Topologie der Photosynthesemembran in ihrer Gesamtheit betrachtet. Daran schließt sich eine vergleichende Diskussion mit Modellen, die von anderen Bakterien aufgestellt wurden, wobei wieder die Bchl b enthaltende *Rp. viridis* Membran besonders berücksichtigt wurde.

6.1. Modell des Lichtsammler Komplexes

In der folgenden Abbildung wurden die vom LHCP erhaltenen Daten zusammengefaßt:

"HOCH-PH" FORM, $\lambda_{MAX.} = 1020\text{NM}$



Das Modell des Lichtsammler Komplexes basiert auf folgenden Überlegungen:

a. Die Lichtsammler Polypeptide sind integrale Membranproteine, bei denen eine helicale Domäne in die Membran hineinreicht. Als solche ließen sie sich nur mit Tensiden (Triton X-100 oder BRIJ 56) aus der Membran herauslösen (s.S. 79). Der hohe helicale Anteil ließ sich aus den CD-Daten im UV ableiten (s.S. 89).

b. Zwei von ihnen besitzen gut zugängliche hydrophile Domänen, die auf der Cytoplasmatischen Seite herausragen. Diese ließen sich proteolytisch in Chromatophoren abbauen (s.S. 109), wohingegen die Versuche an Spheroplasten (s.S. 112) darauf hindeuteten, daß die Peptide hier nicht exponiert sind. Wie neuere Untersuchungen über die Primärstruktur proteolytisch angedauter LH-Peptide an *Rsp. rubrum* zeigten (Brunisholz et al, 1984), sind die LH-Peptide dieses Organismus Transmembranpeptide und als solche auch von der periplasmatischen Seite aus zugänglich. Die SDS-Analyse proteolytisch behandelter Membranen zeigte bei *E. halochloris* dagegen nur einen Abbau von der cytoplasmatischen Seite.

c. Der Lichtsammler Komplex besteht aus fünf Polypeptiden. Drei davon sind typische bakterielle LHCPs mit sehr kleinen MWGs (4.5, 6.0 und 6.5kDa). Ein Protein (28.0kDa) ist normalerweise mit dem RC assoziiert und ein zusätzliches Peptid, (15.5kDa) über das bislang noch keine exakten Aussagen möglich sind. Die Rolle des 15.5kDa Peptides blieb in obigem Modell unberücksichtigt und auch die "H" Untereinheit des RCs findet erst in der folgenden Abbildung ihren Niederschlag. Die Anzahl der Peptide und ihre MWGs wurden nach Isolation des Komplexes, durch SDS Gelelektrophorese ermittelt (s.S. 81). Für das Bchl b haltige Bakterium *Rp. viridis* wurden vergleichbare Daten gefunden (Jay et al, 1983). Wie u.a. elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten (s.S. 86), scheint die H Untereinheit die Stabilität des isolierten LHCP von *E. halochloris* zu erhöhen.

d. Zwei der drei Polypeptide (6.0 und 6.5kDa) tragen Bchl b Chromophore, die kleinste Untereinheit ist wahrscheinlich chromophorfrei (4.5kDa). Zumindest zeigte die Aminosäuresequenz dieses Peptids kein Histidin, und diese AS wird zur Zeit als Bchl-bindende AS diskutiert (Mathews et al, 1979; Brunisholz et al, 1984). Allerdings wurden in der Literatur auch andere Bindungsstellen für Bchle in Erwägung gezogen. So ist die Anzahl der Bchle bei Chlorobien, die mit dem Polypeptid assoziiert sind, nicht allein durch Histidin Koordination erklärbar (Mathews et al, 1979) und auch das große Verhältnis Bchl/Protein bei Chloroflexus (Feick et al, 1982) ist mit Histidin Bindungsstellen nicht in Einklang zu bringen, zumal sich anhand der AS-sequenz zeigen ließ, daß kein Histidin vorkommt (Brunisholz, pers. Mitt.).

e. Die hypothetische Grundeinheit $(\alpha, \beta, \gamma)_1$ trägt dabei beim LHCP von *E. halochloris* zwischen 5 (Bchl/Protein-Verhältnis) und mindestens 8 Chromophore (CD-Daten s.S. 105). Die Differenz dieser beiden Zahlen ließe sich dadurch erklären, daß im nativen Komplex möglicherweise - wie bei anderen LH Komplexen - mehrere solcher Einheiten assoziiert sind. So konnte Cogdell (pers. Mitt.) durch SDS Titrations feststellen, daß bei *Rp. sphäroides* erst die langwellige Absorption verloren geht und erst dann die Dissoziation des hexameren (?) LH-Komplexes einsetzt. Ebenfalls zeigte van Grondelle et al, 1983 durch Fluoreszenzmessungen, daß die kleinste Einheit isolierter Antennen von *Rp. sphäroides* noch immer 8 Chromophore enthält.

f. Die 800nm Absorption wird durch mindesten drei Bchl b Moleküle verursacht, wie die CD-Daten auf S. 105 zeigten. Geht man von einer Gesamtzahl von 5 Chromophoren aus (siehe Punkt e.), dann bleiben zwei über; diese müssen für die 1020nm Absorption verantwortlich sein und sind im 6.5kDa Peptid lokalisiert. (s.S.112). Dies läßt den Schluß zu, daß die oben erwähnten drei Bchle im 6.0kDa Peptid sitzen.

g. Die Bchl b Chromophore sind im hydrophoben Bereich des Polypeptids lokalisiert, zumindest sind sie gut abgeschirmt, wie sich etwa bei Säurebehandlung zeigte (s.S. 93). Auch dies steht im Einklang mit dem LH Komplex von *Rsp. rubrum* (Brunisholz et al, 1984). Bei der Umwandlung in die bei 960nm absorbierende "Niedrig-pH" Form zeigte sich, daß Bchl b weit weniger durch das Protein geschützt ist, da sich bei längerem stehen lassen oder belichten irreversibel Bchl b_{ox} bildeten.

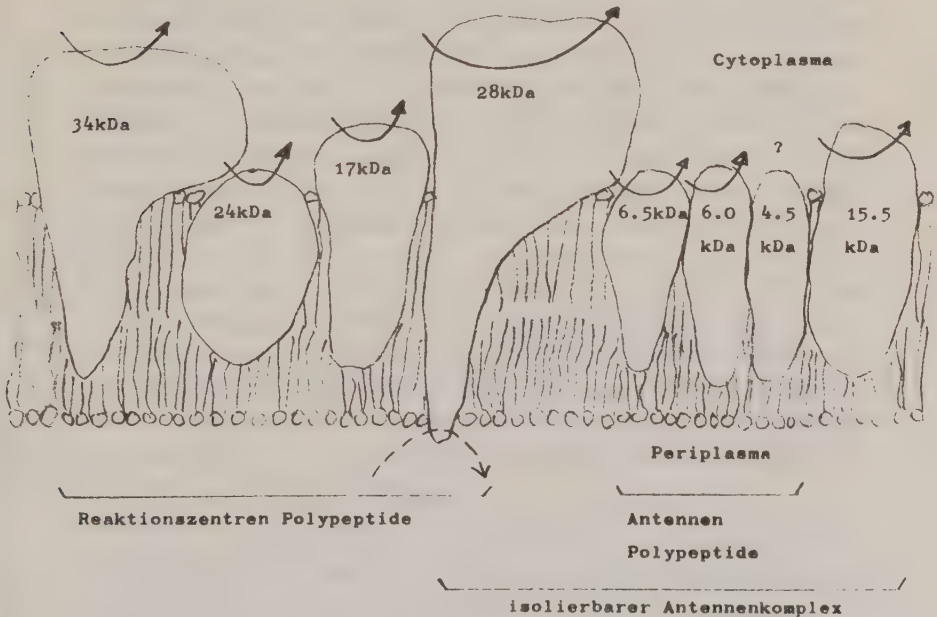
h. In der nativen Form gibt es zwei Typen von Chromophoren ($\lambda_{\text{max.}} = 1020$ und 800nm), welche mindestens 5 bzw. 3 stark gekoppelte Bchle enthalten. Diese Daten wurden aus den CD Spektren auf S.105 erhalten. Eine nähere Charakterisierung wurde bereits unter e. vorgenommen.

i. Durch Veränderung im hydrophilen Teil der LH-Peptide auf der cytoplasmatischen Oberfläche erfolgte selektiv eine Umorientierung der bei 1020nm absorbierenden Bchl b Chromophore. Die gleichen Änderungen kann man erhalten durch Behandlung mit Säure (s.S.95) Harnstoff (s.S. 97) oder Proteasen (s.S. 102), welche alle nur den hydrophilen Teil beeinflussen. Dabei findet zunächst kein Verlust an Bchl b statt, die 960nm-Chromophore werden jedoch destabilisiert (s.o.). Bei den oben angesprochenen Manipulationen verschiebt sich die Absorption von 1020nm nach 960nm und die Zahl der stark gekoppelten, langwellig absorbierenden Chromophore verringert sich auf mindestens zwei (s.S. 105). Die 800nm Komponente bleibt dabei unberührt. Die langwellige Absorption läßt sich mit einer erhöhten Chromophor Aggregation erklären, was mit in vitro Befunden von Bchl a-Triton Komplexen in Einklang ist (Gottstein und Scheer, 1983). In der kürzerwellig absorbierenden 960nm Form kommen sich die entsprechenden Bchle nicht mehr so nahe, jedoch dürften die Unterschiede nur gering sein, da, wie die Fluoreszenzdaten zeigten (s.S. 103), ein Energietransfer von der 800nm auf die längerwellig absorbierende Form immer noch möglich ist. Diesen Befund unter-

stützt auch die Feststellung, daß, solange native Absorption ($\lambda_{\text{max.}} = 1020\text{nm}$) vorliegt, man im Elektronenmikroskop immer relativ große Partikel findet.

6.2. Modell der gesamten Photosynthesemembran

In der folgenden Abbildung ist das Modell der ganzen Photosynthesemembran von *E. halochloris* angegeben. Dies ließ sich v.a. aus den Proteolysedaten an Chromatophoren (inside-out Partikeln) und Spheroplasten (rightside-out Partikeln) aufstellen, und wurde als zweidimensionale Darstellung in Anlehnung an das Modell von *Rp. viridis* (Jay, et al, 1983) gezeichnet.



— enzymatischer Abbau durch Trypsin, Thermolysin und Proteinase K möglich

- - - enzymatischer Abbau nur durch Proteinase K möglich

? = exakte Aussage über einen enzymatischen Abbau wegen der geringen Größe und der schwierigen Anfärbbarkeit des Peptids nicht möglich

Dieses Modell basiert auf folgenden Überlegungen:

a. Zusätzlich zum isolierbaren Lichtsammler Komplex treten in der gesamten Membran nur drei weitere Polypeptide in größeren Mengen auf (34.0, 24.0 und 17.0kDa; s.S. 81). Diese wurden, anlehnend an das Modell von *Rp. viridis* (Jay et al, 1983), als Cytochrombande, L und M Untereinheit des RCs betrachtet. Wie bei *Rp. viridis* ist die gesamte Membran sehr arm an "anderen" Polypeptiden, wie ein Vergleich etwa mit *Rp. sphäroides* (s.S.67) zeigte. Die Einfachheit der Membran im Gel könnte mit ihrer zweidimensional kristallinen Struktur zusammenhängen.

b. Bis auf die kleinste LH-Untereinheit, bei der eine exakte Aussage einmal wegen der geringen Größe (4.5kDa) und zum anderen wegen der schweren Anfärbbarkeit (s.S.83) nicht möglich war, sind alle Proteine auf der cytoplasmatischen Membranseite so weit exponiert, daß sie sich durch Proteasen verdauen ließen. Wie die Reihenfolge der Proteolyse zeigte (Cytochrom, H, L, M und erst dann die Antennenpeptide) sind v.a. die Cytochrombande und die H-Untereinheit des RCs leicht zugänglich. Die Reihenfolge ist für die Behandlung mit Trypsin, Proteinase K und Thermolysin gleich, d.h. in erster Näherung ist die Zugänglichkeit und nicht eine spezifisch exponierte AS-Sequenz entscheidend. Die M Untereinheit des RCs war in dieser Hinsicht die stabilste Bande des RCs. Im Gegensatz dazu ist die L-Untereinheit im RC des Bchl a haltigen Organismus *Rp. capsulata* (Peters und Drews, 1984) ungewöhnlich stabil.

c. Nur die H Untereinheit des RCs ließ sich auch von der periplasmatischen Seite her verdauen (s.S.112), sie sollte also als Transmembranprotein die Membran durchspannen. Im RC Kristall des ebenfalls Bchl b enthaltenden Organismus *Rp. viridis* fand Michel, daß H nur einmal durch die Membran reicht. Hier ist dieses Peptid hauptsächlich cytoplasmatisch orientiert und, wenn überhaupt, ragen nur wenige AS auf der periplasmatischen Seite heraus. Dabei müssen jedoch zwei Aspekte berücksichtigt werden:

Zum einen läßt sich die Lokalisierung der Membran aus den kristallographischen Daten des RCs nicht sicher voraussagen, zum anderen ist nicht auszuschließen, daß das Protein im Verlauf der Kristallisation eine strukturelle Änderung erfährt, und somit Rückschlüsse auf das in vivo System nicht mehr eindeutig sind. Auf der anderen Seite konnte Jay durch radiochemische Iodierung und Immuno-Elektronenmikroskopie zeigen, daß "H" bei *Rp. viridis* ein Transmembranprotein ist. Entweder liegen bei *E. halochloris*, im Vergleich zur Michel Beobachtung andere Verhältnisse vor, die unterschiedliche Primärstruktur des kleinsten LH-Peptids (s.S.85) und die ungewöhnliche Affinität von "H" zum LHCP (s.S. 81) würden dies unterstreichen, oder die erhaltenen Ergebnisse müssen vorsichtiger interpretiert werden. So ist aus den Proteolysedaten nicht auszuschließen, daß nur ein geringer Teil von "H", von der periplasmatischen Seite her abgebaut wird und das restliche Bruchstück auf eine andere Bande fällt (s.S. 112).

6.3. Vergleich mit anderen Modellen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Modelle für die Photosynthesemembran der verschiedensten Bakterien aufgestellt. Die unterschiedlichsten Methoden kamen dabei zur Anwendung, jede jedoch mit spezifischen Vor- und Nachteilen. So muß herausgestellt werden, daß die radiochemische Iodierung von Jay eine Proteinzugänglichkeit überbetont, wohingegen die Proteolyse u.U. kleinere Bruchstücke übersieht.

Die Topologie von Photosynthesemembranen durch gezielte Proteolyse wurde v.a. an Chromatophoren von *Rsp. rubrum* G-9 untersucht (Wiemken et al, 1982; 1983). Auch hier wurde das RC vor dem LHCP abgebaut, es muß also zum Cytoplasma hin orientiert sein. Andere Ergebnisse wurden für das RC von *Rp. sphäroides* angegeben (Hall et al, 1978; Valkies und Feher, 1982). Hier gehen "H" und "M" als Transmembranproteine durch die Membran und die L-Untereinheit ist nur auf der periplasmatischen Seite exponiert (Bachmann et al, 1978)

Im B800/850 Komplex dieses Bakteriums, werden vier Bchle diskutiert, die für die 850nm Absorption verantwortlich sind und parallel zur Helix des Peptids liegen sollen, wohingegen für die 800nm Absorption zwei Chromophore verantwortlich sind, die dazu senkrecht stehen (Kramer et al, 1984). Die entsprechenden Verhältnisse bei *E. halochloris* wären mindestens 3 Chromophore für die 800nm Absorption und wenigstens 2 für die längerwellige, wohingegen bis jetzt keine Daten über deren Orientierung in Bezug zum Polypeptid vorliegen.

Für *Rp. viridis* wurde ein ähnliches Modell w.o. für *E. halochloris* aufgestellt (Jay et al, 1983; 1984). Auf die Problematik der "Überinterpretierung" der aus radiochemischer Iodierung gewonnenen Ergebnisse und der "Untertreibung" bei den Proteolysedaten wurde bereits hingewiesen.

Auch die Membran von *Rp. capsulata* ist asymmetrisch (Peters und Drews, 1983). Hier gehen "H" und "M" des RCs wie bei *Rp. sphäroides* durch die Membran, und auch das 14.0kDa Peptid des LH2 scheint ein Transmembranprotein zu sein. Auf die unterschiedliche Stabilität der RC Peptide dieses Organismus gegenüber Proteasen (Peters und Drews, 1984) im Vergleich zu den Verhältnissen bei *E. halochloris*, wurde bereits hingewiesen. Die photochemische Aktivität des RCs von *Rsp rubrum* ist auch noch vorhanden, wenn man dieses teilweise verdaut. So ist "H" dafür nicht nötig und auch "M" und "L" können bis zu einem 18kDa Stück abgebaut werden (Wiemken und Bachofen, 1984; Gimenez-Gallego et al, 1982; 1983). Die H Untereinheit kann somit als "Kitt" zwischen RC und Antenne betrachtet werden. Diese Beobachtung kann auch mit den *E. halochloris* Daten in Einklang gebracht werden, da einmal die "H" Untereinheit mit dem LHCP isoliert wird, diesen also zu stabilisieren scheint, zum anderen aber diese Fraktion im Elektronenmikroskop eine, wenn auch mit ganzen Chromatophoren verglichen, geringere Ordnung erkennen läßt.

Die Photosynthesemembran von *E. halochloris* ist, wie gesehen, in vieler Hinsicht wie andere Membranen aufgebaut, zeigt auf der anderen Seite aber auch deutliche Unterschiede. Andererseits sind die Ergebnisse an ihr noch nicht so abgerundet wie bei manch anderen Organismen.

Weitere Versuche sollen nun das RC dieses Bchl b haltigen Bakteriums näher charakterisieren (Kalumenos in Präp.), bzw. soll durch gezielte Proteolyse und Differenzspektroskopie eine Zuordnung von SDS-Gelelektrophoretischen Daten mit der photochemischen Aktivität ermöglicht werden, um so evtl. Aussagen über die minimale photosynthetische Einheit ("LM") machen zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Extraktion und anschließende Zuckersäulenchromatographie wurde aus *Rp. viridis*, *E. halochloris* und *E. abdelmalekii* Bchl b isoliert.
2. Durch Chromatographie auf Sepharose wurde eine von oxidiertem Bchl b freie Bchl b Lösung erhalten.
3. Bchl b aus *E. abdelmalekii* ist, wie das aus *E. halochloris*, mit 2,10-THGG verestert. Dagegen sind die Bchl a enthaltenden *Ectothiorhodospiraceen*, ebenso wie eine Reihe anderer, auch halophiler, photosynthetischer Bakterien aus anderen Familien mit Phytol verestert.
4. Als Ausscheidungsprodukt der beiden *Ectothiorhodospiraceen* konnte, insbesondere bei höheren Sauerstoff Partialdrücken, Protoporphyrin-IX identifiziert werden.
5. Die Instabilität von Bchl b, insbesondere gegenüber Sauerstoff, konnte bestätigt werden. Die Oxidationsgeschwindigkeit ist jedoch vom Lösungsmittel abhängig. Zur Stabilisierung eignen sich Petrolether als Lösungsmittel, vor allem aber Triton X-100 in Wasser.
6. Die Photochemie von Bchl b wurde untersucht. Unter aeroben Bedingungen oxidiert Bchl b u.a. zu 3,8-Diacetyl-3-devinyl-8-deethylchl a und zu 3-Acetyl-3-devinyl-8-(1-hydroxi)ethyl-8-deethylchl a; unter anaeroben Bedingungen tritt eine Isomerisierung zu 3-Acetyl-3-devinylchl a ein.
7. Die letztere Reaktion konnte dazu ausgenutzt werden den Extinktionskoeffizienten von Bchl b zu bestimmen ($\epsilon_{794} = 106000$; Lösungsmittel: Ether).
8. Durch Zusatz von Limonen ließ sich beweisen, daß die Photooxidation von Bchl b über einen Singulett Sauerstoff Mechanismus verläuft und sich die Reaktion nach dem Schema einer ene-Reaktion formulieren läßt.

9. Die Dissoziation der Membran von *E. halochloris* wurde mit verschiedenen Detergentien untersucht. In keinem Fall konnten intakte Reaktionszentren isoliert werden. Eine partielle Charakterisierung gelang durch Differenzspektroskopie und SDS-Gelelektrophorese.
10. Dagegen konnte erstmals der Lichtsammler Komplex eines Bchl b haltigen Organismus isoliert werden (Triton X-100). Er enthält die üblicherweise mit dem RC assoziierte "H" Untereinheit als integralen Bestandteil.
11. Die Dissoziation der Membran und die Struktur des Lichtsammler Komplexes wurden biochemisch, spektroskopisch und elektronenmikroskopisch charakterisiert.
12. Lichtsammler Komplexe, Chromatophore, Spheroplasten und ganze Zellen von *E. halochloris* lassen sich durch Säure reversibel in ihrem Absorptionsspektrum kürzerwellig verschieben. Die gleichen Absorptionsänderungen ließen sich bei Chromatophoren und isolierten Antennen auch durch Harnstoff oder Proteasen induzieren..
13. Bei der Umwandlung wird die elektronenmikroskopische sichtbare, kristalline Ordnung der Membran verringert. Gleichzeitig ändert sich die Organisation der Bchl b-Chromophore, aber die Energieübertragung innerhalb der Antenne bleibt erhalten.
14. Die Aminosäuresequenz des kleinsten Antennen Peptids konnte, in Zusammenarbeit mit Dr. Brunisholz (Zürich) teilweise bestimmt werden. Sie wurde mit der bekannten von *Rp. viridis* verglichen.
15. Die Behandlung von Chromatophoren mit Proteasen zeigte einen Abbau der Polypeptide in folgender Reihenfolge: Cytochrom, H, L, M und dann erst die Antennenpeptide. Die "M" Untereinheit ist dabei die stabilste des Reaktionszentrums, die 6.5kDa Einheit des LHCP enthält die Chromophore, die für die 1020nm Absorption verantwortlich sind.

16. Die gleiche Behandlung von Spheroplasten ergab nur einen Abbau der "H" Untereinheit, d.h. diese ist ein Transmembranprotein
17. Ein Membranmodell für *E. halochloris* wurde diskutiert und mit dem anderer, photosynthetischer Bakterien verglichen.

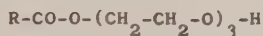
ANHANG

ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN TENSIDE

Im folgenden werden die verwendeten Detergentien kurz, stichpunktartig charakterisiert (Auflistung in alphabetischer Reihenfolge).

1. B-30

BRIJ 30 (Serva); nichtionisch; Triethylenglycolmonolaurylether:



mit $\text{R}=\text{C}_{13}$; MWG ca. 320.

2. B-56

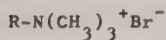
BRIJ 56 (Serva); nichtionisch; Polyoxiethylenmonocetylether;
MWG ca. 400.

3. B-58

BRIJ 58 (Serva); nichtionisch; Polyoxiethylenmonocetylether;
MWG ca. 1050

4. CTAB

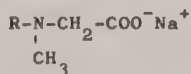
Cetyltrimethylammoniumbromid (Serva); kationisch;



mit $\text{R}=\text{C}_{13}$; MWG ca. 365.

5. Laurylsarkosin

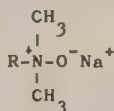
(Serva); anionisch;



mit $\text{R}=\text{C}_{12}$; MWG ca. 293.

6. LDAO

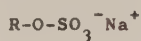
Lauryldimethylammoniumoxid (Bayrol); anionisch;



mit $\text{R}=\text{C}_{12}$;

7. LDS

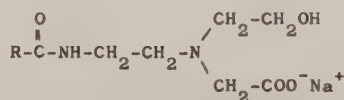
Litiumdodecylsulfat (Serva); anionisch;



mit $\text{R}=\text{C}_{12}$; MWG ca. 272.

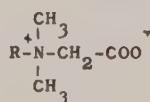
8. R-AM-2L

Rewoteric AM-2L oder Steinapon AM-2L; amphoter; (Rewo); N-β-hydroxyethyl-N-carboximethylfettsäureamidoethylamin



9. R-AM-DML

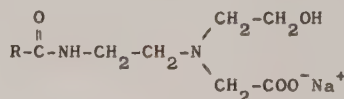
Rewoteric AM-DML oder Steinapon AM-DML (Rewo); amphoter; Lauryldimethylcarboximethylammoniumbetain



mit $\text{R}=\text{C}_{12}$;

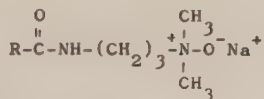
10. R-AM-V

Rewoteric AM-V oder Steinapon AM-V (Rewo); amphoter; N-β-hydroxyethyl-N-carboximethyl-fettsäureamidoethylamin



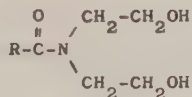
11. R-B 204

Rewominoxid B 204 oder Steinaminoxid B 204 (Rewo); nicht ionisch
bzw schwach kationisch; Alkylamidopropyldimethylaminoxid



12. R-DL 203/S

Rewomid DL 203/S oder Steinamid DL 203/S (Rewo); nicht ionisch;
Laurinsäureethanolamid



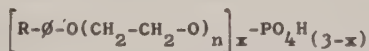
13. R-IPL 203

Rewomid IPL 203 oder Steinamid IPL 203 (Rewo); nicht ionisch;
Laurinsäureisopropanolamid



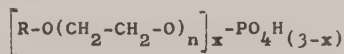
14. R-NP 90

Reurophos NP 90 oder Steinaphat NP 90 (Rewo); anionisch; No-
nylphenylpolyglycolether-phosphat



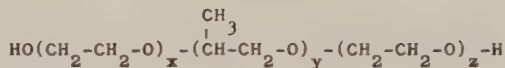
15. R-OP 90

Reurophos OP 90 oder Steinaphat OP 90 (Rewo); anionisch;
Fettalkoholpolyglycoletherphosphat



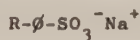
16. R-PO

Rewopal PO oder Steinapal PO (Rewo); nicht ionisch; Copolymerisat von Propylenoxid und Ethylenoxid



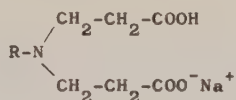
17. R-Sulfonsäure

Reworyl-K oder Steinaryl-Sulfonsäure K (Rewo); anionisch;



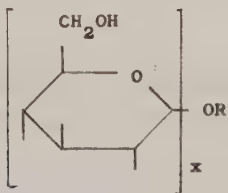
18. Deriphat-160C

(Henkel); partielles Natriumsalz der β -Iminodipropionsäure



19. T-BG 10

Triton BG 10 (Bayrol); nicht ionisch; Alkylglycosid



mit $X = 1-5$ und $R = \text{C}_8/\text{C}_{10} = 1/1$

20. T-DF 12

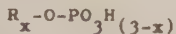
Triton DF 12 (Bayrol); nicht ionisch; Fettalkoholethoxylat

21. T-DF 16

Triton DF 16 (Bayrol); Fettalkoholpolyglycolether $\hat{=}$ Fettalkohol-ethoxylat; nicht ionisch; wahrscheinlich 5-10 Ethoxylatmoleküle; $R < \text{C}_{12}$ (des Fettalkohols)

22. T-H66

Triton H66 (Bayrol); anionisch; Alkylphosphatester: Gemisch aus Mono- und Dialkylestern

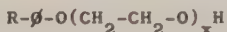


23. T-QS 44

Triton QS 44 (Bayrol); anionisch; Alkylphosphatester; wie T-H66n nur R etwas verändert.

24. T-X45

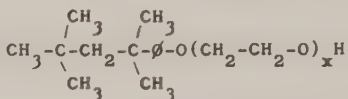
Triton X45 (Bayrol); nicht ionisch;



mit $R \approx C_8$ und $x = 2-3$

25. T-X100

Triton X100 (Bayrol); nicht ionisch;



mit $x = 4-5$; MWG = 362 für $x=4$;

26. Tween 60

(Serva); nicht ionisch; Stearylsorbitonpolyethylenglycolether; MWG ca. 1300;

LITERATURVERZEICHNIS

- K. Adler, E. Brecht, A. Meister, O. Schmidt und K.-H. Süß;
Kulturpflanze XXVII, 13-48; 1979.
- I. Agalidis und F. Reiss-Husson; Biochem. Biophys. Acta 724;
340-351; 1983.
- R.C. Bachmann, K. Gillies und J.Y. Takemoto; Biochem. 20;
4590-4596; 1981.
- R.C. Bachmann und J.Y. Takemoto; Biochem. Int. 7; 137-145;
1983.
- D.L. Baumgarten; Masters-Thesis, University of California,
Berkeley; 1970.
- J. Beck und G. Drews; Z. Naturforsch. 37c; 199-204; 1982.
- J. Benz; Dissertation Universität München; 1980.
- H. Biebl und G. Drews; Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd.
Infektionskr. Hyg. Abt. 123; 425-452; 1969.
- J.D. Bolt, K. Sauer, J.A. Shiozawa und G. Drews; Biochem.
Biophys. Acta 635; 535-541; 1981.
- J.D. Bolt, C.N. Hunter, R.A. Niederman und K. Sauer; Photo-
chem. Photobiol. 34; 653-656; 1981.
- R.G. Brereton, V. Rajananda, T.J. Blake, J.K.M. Sanders und
D.H. Williams; Tetrahedron Let. 21; 1671-1674; 1980.
- R.G. Brereton und J.K.M. Sanders; J. Org. Magn. Reson. 3;
150-152; 1982.
- R.G. Brereton und J.K.M. Sanders; J. Chem. Soc. Perkin Trans.
I; 423-430; 1983.
- R.G. Brereton und J.K.M. Sanders; J. Chem. Soc. Perkin Trans.
I; 431-434; 1983.
- R.G. Brereton und J.K.M. Sanders; J. Chem. Soc. Perkin Trans.
I; 435-437; 1983.
- H. Brockmann Jr. und I. Kleber; Tetrahedron Let. 25; 2193-
2195; 1970.

- H. Brockmann Jr., W. Trowitzsch und V. Wray; *J. Org. Magn. Res.* 8; 380-381; 1976.
- H. Brockmann Jr. und A. Lipinski; *Arch. Microbiol.* 136; 17-19; 1983.
- G. W. Brudvig, S.T. Worland und K. Sauer; *Biophys. J.* 37; 1982
- R.A. Brunisholz, F. Suter und H. Zuber; *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 365; 675-688; 1984.
- R.A. Brunisholz, V. Wiemken, F. Suter, R. Bachofen und H. Zuber; *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 365; 689-701; 1984.
- H. Budzikiewicz; in "The Porphyrins", D. Dolphin (ed.); Academic Press, New York; 1978.
- P. Cuatrecasas und C.B. Anfinsen; *Meth. Enzym.* 22; 345-378; 1971.
- A.M. Crestfield, S. Moore und W.H. Stein; *J. Biol. Chem.* 238; 622-627; 1963
- J.S. Cox und D.G. Whitten; *J. Am. Chem. Soc.* 104; 516-521; 1982.
- G.A. Corker; *Photochem. Photobiol.* 24; 617-628; 1976.
- R.J. Cogdell und A.R. Crofts; *Biochem. Biophys. Acta* 502; 409-416; 1978.
- R.J. Cogdell, J.G. Lindsay, G.P. Reid und G.D. Webster; *Biochem. Biophys. Acta* 591; 312-320; 1980.
- R.J. Cogdell und J.P. Thornber; *FEBS-Let.* 122; 1-8; 1980.
- R.J. Cogdell, J. Valentine, J.G. Lindsay und K. Schmidt; *Biochem. Soc. Trans.* 10; 333-334; 1982.
- R.J. Cogdell und J. Valentine; *Photochem. Photobiol.* 38; 769-772; 1983.
- R.J. Cogdell; *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34; 21-45; 1983.
- R.K. Clayton; *Photochem. Photobiol.* 5; 669-677; 1966.
- R.K. Clayton und B.J. Clayton; *Biochem. Biophys. Acta* 501; 478-487; 1978.

- R.K. Clayton; Cambridge University Press, 1980
- R.K. Clayton und B.J. Clayton; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78;
5583-5587; 1981.
- Y.-H. Chen, J.T. Yang und H.M. Martinez; Biochem. 11; 4120-
4131; 1972.
- M.B. Caple, H. Chow und C.E. Strouse; J. Biol. Chem. 253;
6730-6737; 1978.
- M.S. Davis, A. Forman, L.K. Hanson, J.P. Thornber und J. Fajer;
J. Phys. Chem. 83; 3325-3332; 1979.
- G. Drews und P. Giesbrecht; Arch. Microbiol. 53; 255-262; 1966.
- G. Drews; Arch. Microbiol. 130; 325-327; 1981.
- P.L. Dutton, R.C. Prince und D.M. Tiede; Photochem. Photobiol.
28; 939-949; 1978.
- K.E. Eimhjellen, O. Aasmundrud und A. Jensen; Biochem. Biophys.
Res. Com. 10; 232-236; 1963.
- K.E. Eimhjellen, H. Steensland und I. Traetteberg; Arch. Micro-
biol. 59; 82-92; 1967.
- H. Engelhardt, W. Baumeister und W.O. Saxton; Arch. Microbiol.
135; 169-175; 1983.
- G. Feher, A.J. Hoff, R.A. Isaacson und L.C. Ackerson; Ann.
N.Y. Acad. Sci. 244; 239; 1975.
- G. Fehr und M.Y. Okamura; in "The Photosynthetic Bacteria",
R.K. Clayton und W.R. Sistrom (eds.); Plenum Press, New
York; 1978.
- R. Feick und G. Drews; Z. Naturforsch. 34c; 196-199; 1979.
- R. Feick, M. Fitzpatrick und R.C. Fuller; J. Bacteriol. 150;
905; 1982.
- F.K. Fong und V.J. Koester; J. Am. Chem. Soc. 97; 6888-6890;
1975.
- F.K. Fong; J. Am. Chem. Soc. 97; 6890-6892; 1975.

- F.K. Fong, V.J. Koester und J.S. Polles; J. Am. Chem. Soc. 98; 6406-6408; 1976.
- E.A. Galinski und H.G. Trüper; FEMS Microbiol. Let. 13; 357-360; 1982.
- A. Garcia, L.P. Vernon, B. Ke und H. Mollenhauer; Biochem. 7; 326-332; 1968.
- H. Gest und J.L. Favinger; Arch. Microbiol. 136; 11-16; 1983.
- G. Gimenez-Gallego, P. Suanzes und J.M. Ramirez; FEBS-Let. 149; 59-62; 1982.
- G. Gimenez-Gallego, P. Suanzes und J.M. Ramirez; FEBS-Let. 162; 91-95; 1983.
- G. Gingras und G. Jolchine; in "Proc. of the International Congress of Photosynthesis Research", H. Metzner (ed.); Freudenstadt; 1969.
- G. Gingras; in "The Photosynthetic Bacteria", R.K. Clayton und W.R. Sistrom (eds.); Plenum Press New York; 1978.
- A. Gloe; Dissertation Universität Göttingen; 1977.
- C. Godinot und D.C. Gautheron; Meth. Enzym. 55; 112-114; 1979.
- K. Gollnick; Adv. Photochem. 6, 2; 1968
- K. Gollnick; in "Radiation Research, Biomedical, Chemical and Physical Perspectives"; 590-611; 1975.
- J. Gottstein und H. Scheer; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80; 2231-2234; 1983.
- J. Gottstein; Diplomarbeit Universität München; 1984.
- N. Greenfield, B. Davidson und G.D. Fasman; Biochem. 6; 1630-1635; 1967.
- N. Greenfield und G.D. Fasman; Biochem. 8; 4108-4116; 1969.
- R. van Grondelle, C.N. Hunter, J.G.C. Bakker und H.J.M. Kramer; Biochem. Biophys. Acta 723; 30-36; 1983.

- A. Hajek; Zulassungsarbeit Universität München; 1981.
- R.L. Hall, P.F. Doorley und R.A. Niederman; Photochem. Photobiol. 28; 273-276; 1978.
- T.A. Hansen und H. Veldkamp; Arch. Microbiol. 92; 45-58; 1973.
- H. Hayashi, T. Nozawa, M. Harano und S. Morita; J. Biochem. 89; 1853-1861; 1981.
- H. Hayashi, M. Miyao und S. Morita; J. Biochem. 91; 1017-1027; 1982.
- H. Hayashi, T. Nozawa, M. Hatano und S. Morita; J. Biochem. 91; 1029-1038; 1982.
- R.L. Henrikson, W.H. Stein, A.M. Crestfield und S. Moore; J. Biol. Chem. 240; 2921-2934; 1968.
- J.P. Hennessey Jr. und W.C. Johnson Jr.; Biochem. 20; 1085-1094; 1981.
- A.J. Hoff und K. Möbius; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75; 2296-2300; 1978.
- A.J. Hoff; in: Symp. on Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles; Konstanz; 1984.
- C. Houssier und K. Sauer; J. Am. Chem. Soc. 92; 779-791; 1970.
- P.H. Hynninen; Z. Naturforsch. 36b; 1010-1016; 1981.
- H.H. Inhoffen, P. Jäger, R. Mälhopp und C.D. Mengler; Liebigs Ann. Chem. 704; 188-207; 1967.
- J.F. Imhoff und H.G. Trüper; Arch. Microbiol. 114; 115-121; 1977.
- J.F. Imhoff, F. Hashwa und H.G. Trüper; Arch. Hydrobiol. 84; 381-388; 1978.
- J.F. Imhoff, H.G. Sahl, G.S.H. Soliman und H.G. Trüper; Geomicrobiol. J. 1; 219-233; 1979.
- J.F. Imhoff, B.J. Tindall, W.D. Grant und H.G. Trüper; Arch. Microbiol. 130; 238-242; 1981.

- J.F. Imhoff und H.G. Trüper; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2; 228-234; 1981.
- J.F. Imhoff; System. Appl. Microbiol. 4; 512-521; 1983.
- B.K. Jap, M.F. Maestre, S.B. Hayward und R.M. Glaeser; Biophys. J. 43; 81-89; 1983.
- F. Jay, M. Lambillotte und K. Mühlethaler; Eur. J. Cell Bio. 30; 1-8; 1983.
- F. Jay, M. Lambillotte, W. Stark und K. Mühlethaler; EMBO J. 3; 773-776; 1984.
- B. Jirgensons; Circular Dichroism of Proteins, Springer Verlag New York, 1973.
- O.T.G. Jones; in "The Photosynthetic Bacteria", R.K. Clayton und W.R. Sistrom (eds.), Plenum Press, New York; 1978.
- J.J. Katz; Rev. Appl. Spectroscop. 6; 201; 1968.
- J.J. Katz, H.H. Strain, A.L. Harkness, M.H. Studier, W.A. Svec, T.R. Janson und B.T. Cope; J. Am. Chem. Soc. 94; 7938; 1972.
- D.R. Kearns; Chem. Rev. 71; 395-427; 1971.
- V.V. Klimov, V.A. Shuvalov, I.N. Krakhmaleva, A.V. Klevanik und A.A. Krasnovskii; Biokhimiya 42; 519-530; 1976.
- H.J.M. Kramer, R. van Grondelle, C.N. Hunter, W.H.J. Westerhuis und J. Ames; Biochem. Biophys. Acta 765; 156-165; 1984.
- H. Kurreck, B. Kirste und W. Lubitz; Angew. Chem. 96; 171-193; 1984.
- U.K. Laemmli; Nature 227; 680-685; 1970.
- F. Lendzian; Dissertation Universität Berlin; 1982.
- B.W. Matthews, R.E. Fenna, M.C. Bolognesi, M.F. Schmid und J.M. Olson; J. Mol. Biol. 131; 259-285; 1979.
- C.D. Mengler; Dissertation Universität Braunschweig; 1966.
- H. Michel; J. Mol. Biol. 158; 567-572; 1982.

- P.A.M. Michels und W.N. Konings; *Biochem. Biophys. Acta* 507; 353-368; 1978.
- K.R. Miller; *Sci. Amer.* 241; 100-111; 1979.
- K.R. Miller; *Nature* 300; 53-55; 1982.
- J.R. Norris, H. Scheer, M.E. Druyan und J.J. Katz; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71; 4897-4900; 1974.
- J.R. Norris, H. Scheer und J.J. Katz; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244; 260-280; 1975.
- E. Odermatt, M. Snozzi und R. Bachofen; *Biochem. Biophys. Acta* 591; 372-380; 1980.
- J. Oelze; *Biochem. Biophys. Acta* 509; 450-461; 1978.
- J. Oelze; *Biochem. Biophys. Acta*; in press; 1984
- M.Y. Okamura, L.A. Steiner und G. Feher; *Biochem.* 13; 1394; 1974.
- T. Omata und N. Murata; *Plant & Cell Physiol.* 24; 1093-1100; 1983.
- R.M. Pearlstein; *Photochem. Photobiol.* 35; 835-844; 1982.
- J. Peters, J.Y. Takemoto und G. Drews; *Biochem.* 22; 5660-5667; 1983.
- J. Peters und G. Drews; *Eur. J. Cell Biol.* 29; 115-120; 1983.
- J. Peters und G. Drews; *FEBS-Let.* 162; 57-60; 1983.
- J. Peters und G. Drews; *FEMS Microbio. Let.* 17; 235-237; 1983.
- J. Peters und G. Drews; *J. Bacteriol.* 158; 983-989; 1984.
- N.L. Pucheu, N.L. Kerber und A.F. Garcia; *Arch. Microbiol.* 109; 301-305; 1976.
- J.C. Raymond und W.R. Sistrom; *Arch. Microbiol.* 59; 255-268; 1967.
- J.C. Raymond und W.R. Sistrom; *Arch. Microbiol.* 69; 121-126; 1969.
- N. Risch, T. Kemmer und H. Brockmann Jr.; *Liebigs Ann. Chem.* 585-594; 1978.

- D.W. Reed und R.K. Clayton; *Biochem. Biophys. Res. Com.* 30; 471; 1968.
- D.W. Reed, D. Raveed und M. Reporter; *Biochem. Biophys. Acta* 387; 368; 1975.
- D. Rosen, M.Y. Okamura und G. Feher; *Biophys. J.* 25; 204a; 1979.
- D. Rosen, M.Y. Okamura und G. Feher; *Biochem.* 19; 5687-5691; 1980.
- N. Sato und N. Murata; *Biochem. Biophys. Acta* 501; 103; 1978
- K. Sauer; in "Bioenergetics of Photosynthesis"; Academic Press Inc.; San Francisco; 115-181; 1975.
- K. Sauer und L.A. Austin; *Biochem.* 17; 2011-2019; 1978.
- V.P. Saxena und D.B. Wetlaufer; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68; 669-672; 1971.
- H. Scheer, W.A. Svec, B.T. Cope, M.H. Studier, R.G. Scott und J.J. Katz; *J. Am. Chem. Soc.* 96; 3714-3716; 1974.
- H. Scheer und J.J. Katz; in "Porphyrins and Metalloporphyrins" K.M. Smith (ed.); Elsevier Scientific Publishing Comp., Amsterdam; 1975.
- H. Scheer, J.J. Katz und J.R. Norris; *J. Am. Chem. Soc.* 99; 1372-1381; 1977.
- H. Scheer, H. Wieschhoff, W. Schäfer, E. Cmiel, B. Nitsche, H.-M. Schiebel und H.-R. Schulten; in: *Adv. in Photosynthesis Res.*, in *Proc. VIth Int. Congr. on Photosynthesis*, Brüssel, 1983.
- G.O. Schenck, K. Gollnick, G. Buchwald, S. Schroeter und G. Ohloff; *Liebigs Ann. Chem.* 674; 93-109; 1964.
- A. Scherz und W.W. Parson; *Biochem. Biophys. Acta*; in press

- H.A.W. Schneider; Ber. Deut. Bot. Ges. 88; 83-123; 1975.
- K. Schmidt; in "The Photosynthetic Bacteria", R.K. Clayton und W.R. Sistrom (eds.), Plenum Press, New York; 1978.
- J.R.L. Smith und M. Calvin; J. Am. Chem. Soc. 88; 4500-4506; 1966.
- K.M. Smith; in "Porphyrins and Metalloporphyrins", K.M. Smith (ed.), Elsevier Scientific Publishing Comp., Amsterdam; 1975.
- S. Schoch und W. Schäfer; Z. Naturforsch. 33c; 408-412; 1978.
- S. Schoch, U. Lempert, H. Wieschhoff und H. Scheer; J. Chrom. 157; 357-364; 1978.
- R.E.B. Seftor und J.P. Thornber; Biochem. Biophys. Acta; in press; 1984.
- M. Snozzi und R. Bachofen; Biochem. Biophys. Acta 546; 236-247; 1979.
- W. Stark, W. Kühlbrandt, I. Wildhaber, E. Wehrli und K. Mühlethaler; EMBO J. 3; 777-783; 1984.
- R. Steiner; Zulassungsarbeit Universität München; 1980.
- R. Steiner, W. Schäfer, I. Blos, H. Wieschhoff und H. Scheer; Z. Naturforsch. 36c; 417-420; 1981.
- R. Steiner, H. Wieschhoff und H. Scheer; J. Chrom. 242; 127-134; 1982.
- H.H. Strain und W.A. Svec; in "The Chlorophylls", L.P. Vernon und G.R. Seely (eds.); Academic Press, 1966.
- J.Y. Takemoto, J. Peters und G. Drews; FEBS Let. 142; 227-230; 1982.
- K. Tanaka, T. Kakuno, Y. Yamashita und T. Horio; J. Biochem. 93; 159-167; 1983.
- K. Tanaka, T. Kakuno, Y. Yamashita und T. Horio; J. Biochem. 94; 1815-1826; 1983.

- J.P. Thornber; Biochem. Biophys. Acta 172; 351-354; 1969
- J.P. Thornber; Meth. Enzym. 23; 688-691; 1971.
- J.P. Thornber, P.L. Dutton, J. Fajer, A. Forman, D. Holten, J.M. Olson, W.W. Parson, R.C. Prince, D.M. Tiede und M. W. Windsor; in "Proc. of the 4th International Congress on Photosynthesis; 1977.
- J.P. Thornber und J.M. Thornber; Meth. Enzym. 69; 172-178; 1980.
- J. Tinoco, R.W. Woody und D.F. Bradley; J. Chem. Phys. 38; 1317; 1963.
- T.L. Trosper, D.L. Benson und J.P. Thornber; Biochem. Biophys. Acta 460; 318-330; 1976.
- H.G. Trüper; J. Bacteriol. 95; 1910-1920; 1968.
- H.G. Trüper und J.F. Imhoff; in "The Prokaryotes", M.P. Starr, H.G. Trüper, A. Balows und H.G. Schlegel (eds.); Springer Verlag; 1982.
- K. Tsuji, K. Tanaka, K. Sakata-Sogawa, G. Soe, T. Kakuno, J. Yamashita und T. Horio; J. Biochem. 93; 699-707; 1983.
- G.E. Valkiers und G. Feher; J. Cell Bio. 95; 179-188; 1982.
- W. Welte und W. Kreutz; Biochem. Biophys. Acta 692; 479-488; 1982.
- H.W. Whitlock Jr., R. Hanauer, M.Y. Oester und B.K. Bower; J. Am. Chem. Soc. 91; 7485-7489; 1969.
- V. Wiemken, R. Theiler und R. Bachofen; J. Bioenerg. und Bio-membr. 13; 181-194; 1981.
- V. Wiemken und R. Bachofen; Biochem. Biophys. Acta 681; 72-76; 1982.
- V. Wiemken, R. Brunisholz, H. Zuber und R. Bachofen; FEMS Microbiol. Let. 16; 297-301; 1983.
- V. Wiemken und R. Bachofen; FEBS-Let. 166; 155-159; 1984.

J.C. Williams, L.A. Steiner, R.C. Ogden, M.I. Simon und G.

Feher; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80; 6505-6509; 1983.

R.W. Woody und J. Tinoco; J. Chem. Phys. 46; 4927; 1967.

H. Zürrer, M. Snozzi, K. Hanselmann und R. Bachofen; Biochem.

Biophys. Acta 460; 273-279; 1977.

LEBENS LAUF

4.11.1954	Geburt in München
1961-1965	Volksschule an der Ichostr., München
1965-1975	Asam Gymnasium, München
Juni 1975	Abitur
1975-1976	Bundeswehr
1976	Beginn des Studiums der Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig Maximilians Universität in München
1980	Zulassungsarbeit bei Herrn Prof. H. Scheer am Botanischen Institut der Universität München
1981	Staatsexamen
Januar 1982	Beginn der Dissertation bei Herrn Prof. H. Scheer

